ÜBER DIE REINIGUNG VON SCHILDDRÜSENZELLMEMBRANEN

WOLFGANG STOIBER

Diss München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0016

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

ÜBER DIE REINIGUNG VON SCHILDDRÜSENZELLMEMBRANEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
WOLFGANG STOIBER
AUS
MÜNCHEN

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.C.R.Pickardt
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.E.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1983

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
	- Problematik	1
	- endokrine Regulation, Hormonrezeptoren, Schilddrüsenregelkreis	1
	- Pathogenese der diffusen Hyperthyreose bei Morbus Basedow	2
	- Zielsetzung der Arbeit	4
2.	METHODEN UND MATERIALIEN	6
	Vorbemerkungen: Methoden zur Auftrennung von Zellhomogenaten	6
	- grobe Membranpräparation	6
	- Zweiphasensystem	6
	- isopyknische Zentrifugation im Dichtegradienten	6
	- präparative isoelektrische Fokussierung	7
2.1.	Grobe Präparation von Plasmamembranen boviner und humaner Schilddrüsen	8
2.1.1.	Standardpräparationen	8
2.1.2.	Vorversuche zur Standardpräparation	10
2.2.	Auftrennung der groben Membranpräparation über das Zweiphasensystem	11
2.2.1.	Auftrennung über ein modifiziertes Zweiphasensystem nach BRUNETTE/TILL	11
2.2.2.	Vorversuche mit dem Zweiphasensystem	12
2.3.	Auftrennung durch isopyknische Zentrifugation im Dichtegradienten	13
2.3.1.	Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten	13
2.3.1.1.	Der kontinuierliche Saccharosegradient	13
2.3.1.2.	Vorversuche und Änderungen des Versuchsablaufs	16
2.3.1.3.	Inkubationsversuch mit J^{125} - TSH	17
2.3.2.	Auftrennung über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten	18
2.3.2.1.	Auftrennung der groben Membranpräparation	18
2.3.2.2.	Auftrennung des im Zweiphasensystem vorgereinigten Materials über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten	19

Seite

2.3.3. Dichtegradienten mit Metrizamide 19
2.4. Auftrennung durch präparative isoelektrische Fokussierung 21
2.4.1. Isoelektrische Fokussierung mit Glyceringradienten 21
2.4.2. Isoelektrische Fokussierung mit Saccharosegradienten 22
2.5. J^{125}-Markierung und Membranreinigung von bovinem TSH 23
2.6. Der Radiorezeptorassay (RRA) für TSH und TDA 24
2.6.1. Die Inkubation 24
2.6.2. Trennung von membrangebundenem und freiem Material 24
2.6.3. Vergleich zwischen B/F-Trennung durch PEG-Fällung und reiner Zentrifugation 26
2.6.4. Verdrängungskurven mit TSH 27
2.7. Proteinbestimmung 27
2.7.1. Proteinbestimmung nach LOWRY 27
2.7.2. Bio-rad-Methode 29
2.7.3. Vergleich zwischen LOWRY- und Bio-rad-Methode 31
2.8. Bestimmung von proteingebundenem Jod (PBI) 31
2.9. Enzymbestimmungen 31
2.9.1. Cholinesterase 31
2.9.2. 5'Nukleotidase 32
2.9.3. Alkalische Phosphatase 33
2.9.4. Cytochrom-Oxydase 34
2.9.5. Citratsynthase 35
2.9.6. Isocitratdehydrogenase 36
2.9.7. Laktatdehydrogenase 37
2.9.8. ß-Glucuronidase 37
2.9.9. Glucose-6-Phosphatase 38

3. ERGEBNISSE 40
3.1. Untersuchungen mit der groben Membranpräparation 40
3.1.1. Einfluß der Zentrifugationskraft auf die Membranpräparation 40
3.1.2. Vergleich zwischen hypo- und isotoner Präparation 40
3.1.3. Eichkurven der groben Membranpräparation 41

Seite

3.2. Ergebnisse der Auftrennung mit dem Zweiphasensystem 42
3.2.1. Wiederfindung des Proteins 44
3.2.2. Vergleich zwischen grober Membranpräparation und Zweiphasensystem-gereinigtem Material 44
3.2.3. Eichkurven für Pellets aus dem Zweiphasensystem 46
3.3. Ergebnisse der Auftrennung durch isopyknische Zentrifugation 46
3.3.1. Ergebnisse des Metrizamidegradienten 46
3.3.2. Ergebnisse der kontinuierlichen Saccharosegradienten 48
3.3.3. Ergebnisse der Inkubationsversuche mit J^{125}-TSH 53
3.3.4. Ergebnisse der diskontinuierlichen Saccharosegradienten 56
3.3.5. Ergebnisse der Auftrennung von Zweiphasensystem-gereinigtem Material über einen diskontinuierlichen Gradienten 59
3.3.6. Ergebnisse der Verdrängungskurven 59
3.3.7. Ergebnisse des SCATCHARD-Plots 61
3.4. Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung 62
3.4.1. pH-Gradient 62
3.4.2. Proteinverteilung 62
3.4.3. Bindungskurven 64
3.5. Ergebnisse der Enzymbestimmung 66
3.6. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung 68

4. DISKUSSION 73

5. ZUSAMMENFASSUNG 82

6. LITERATURVERZEICHNIS 84

1. Einleitung

Bei dem Krankheitsbild, das seit Mitte des letzten Jahrhunderts im deutschen Sprachraum als M. Basedow, in den englischsprachigen Ländern unter der Bezeichnung "Graves' disease" bekannt ist, treten Autoantikörper auf, die stimulierend auf die Schilddrüsenfunktion wirken und so eine diffuse Hyperthyreose erzeugen. Bei den Patienten, die das klinische Bild der diffusen Hyperthyreose zeigen, lassen sich jedoch nur in 60-90 % aller Fälle (46) Schilddrüsen-stimulierende Autoantikörper nachweisen. In der Diagnostik dieser Erkrankung ist es von Interesse, ob stimulierende Antikörper auch bei den 10-40 % der Patienten vorhanden sind, die zwar die klinische Symptomatik haben, bei denen aber mit den herkömmlichen Bestimmungsmethoden keine Schilddrüsen-stimulierenden Antikörper meßbar sind.

Seit Ende des 19. Jahrhunderts, als die ersten Hormone entdeckt worden waren, wurde versucht, in das Prinzip der humoralen Informationsübertragung Einblick zu gewinnen. Zuerst wurden spezielle Strukturen an den Wirkorten, an die sich Hormone spezifisch anlagern, nur postuliert, seit den 50er Jahren wurden zunehmend experimentell belegbare Hinweise auf Struktur und Wirkungsweise von "Rezeptoren" in menschlichen Geweben gefunden. Bei der Erforschung der Insulinwirkung auf die Zelle wurden auf dem Gebiet der Endokrinologie erste Erkenntnisse über die Bedeutung von in der Plasmamembran liegenden Rezeptoren für die Weitergabe der Hormonwirkung gesammelt (11, 20). Nach dem heutigen Wissensstand kann man von drei unterschiedlichen Rezeptorlokalisationen ausgehen (5):

1. Rezeptoren z.B. für Schilddrüsenhormone wurden vor allem im Zellkern identifiziert.
2. Freie Rezeptoren für Steroidhormone wurden im Cytoplasma nachgewiesen; nach der Bindung des Steroids wurde der Rezeptor-Effektor-Komplex im Kern gefunden.
3. Für Proteohormone, Releasing Factors und Katecholamine liegen die Rezeptoren nach außen gerichtet in der Plasmamembran.

Für die Regulation der Schilddrüsenfunktion sind besonders die unter 3. beschriebenen Rezeptortypen und die auf sie wirkenden Proteohormone von Bedeutung:

Das hypothalamische TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), ein L-(pyro)-Glu-L-His-L-Pro(NH_2)-Tripeptid gelangt über die Eminentia mediana des Hypothalamus, die mit einem Pfortadersystem im Hypophysenstiel die spezielle neurosekretorische Verbindung darstellt, zum Hypophysenvorderlappen (HVL). Es ist für die Regulation der Sensibilität der thyreotropen HVL-Zellen gegenüber der suppressiven Wirkung der Schilddrüsenhormone verantwortlich (27) und stimuliert nach akuter Gabe die Freisetzung von Thyreoidea stimulierendem Hormon (TSH) ins periphere Blut. TSH lagert sich dann dem speziellen TSH-Rezeptor in der Plasmamembran des Thyreozyten an. Ein Effekt der Bindung von TSH an den spezifischen Rezeptor ist die Steigerung der Aktivität der Adenylcyclase der Membran und damit die vermehrte Bildung von cyclo-AMP (cAMP) aus ATP. cAMP gilt heute als hauptsächlicher intracellulärer Überträger der TSH-Wirkung; der Zunahme seiner Konzentration folgt eine vermehrte Synthese und Freisetzung von T_4 und in bedeutend geringerem Ausmaß auch von T_3. Die Konzentrationserhöhung der peripheren Schilddrüsenhormone führt über eine negative Rückkoppelung zu einer Abnahme der TSH-Freisetzung aus der Hypophyse.

Die Schilddrüsen-stimulierenden IgG-Autoantikörper (29, 30) des M. Basedow haben vermutlich einen vergleichbaren Wirkungsmechanismus wie TSH (1, 32, 45). Die Autoantikörper tragen verschiedene Bezeichnungen, die aus den unterschiedlichen Nachweisverfahren abgeleitet werden:

- Long Acting Thyroid Stimulator (LATS) bei Nachweis der Wirkung durch eine im Vergleich zu TSH langanhaltende Stimulation der Mäuseschilddrüse im Bioassay (28, 30);
- Thyreoidea stimulierendes Immunglobulin (TSI) bei Nachweis der biologischen Aktivität über Erhöhung der Konzentration an cAMP im in vitro-Test mit humanem oder animalischem Schilddrüsengewebe oder

- Thyrotropin Displacing Activity (TDA) bei Verdrängung von TSH von seiner spezifischen Bindungsstelle im Radiorezeptorassay,

um nur die wichtigsten zu nennen.

Es wird vermutet, daß die Schilddrüsen-stimulierenden Immunglobuline mit TSH um den gleichen Rezeptor konkurrieren und dort auch den gleichen Vorgang auslösen, der dann zur Bildung und Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen führt (33). Die Aktivität dieser extrahypophysären Schilddrüsen-stimulierenden Substanzen unterliegt nicht dem physiologischen Regelkreis der Schilddrüsenhormonsekretion, so daß die zum Krankheitsbild des M. Basedow gehörige diffuse Hyperthyreose resultiert.

Es stellt sich die Frage, ob Schilddrüsen-stimulierende Immunglobuline im Serum von den 10-40 % der Patienten mit diffuser Hyperthyreose, die von den bisherigen Bestimmungsmethoden nicht erfaßt werden, vorhanden sind. Ein Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems ist eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Nachweismethode. Beim Radiorezeptorassay, bei dem die Verdrängung von radioaktiv markiertem TSH vom Rezeptor durch Schilddrüsen-stimulierende Autoantikörper gemessen wird, könnte dies durch eine Steigerung der Zahl der spezifischen Bindungsstellen im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge, also durch höheren Anreicherungsgrad der Rezeptoren zu erreichen sein.

Um Rezeptoren anzureichern, d. h. TSH-Rezeptor-Protein zu konzentrieren, können verschiedene Wege beschritten werden:

So läßt sich durch die Wirkung von Detergentien auf die Zellmembran eine Fraktion von "löslichen" TSH-Rezeptoren präparieren (21, 38).

Andererseits besteht die Möglichkeit, den Rezeptor in seiner physiologischen Umgebung, der Zellmembran, zu belassen, die Membranfraktion aus Zellhomogenaten durch verschiedene Zentrifugierschritte abzutrennen und mit verschiedenen Methoden anzureichern (54).

Nachdem die Membranfraktionen die Konzentrierungsschritte durchlaufen haben, wird der erzielte Reinigungseffekt geprüft. Zur Objektivierung und Quantifizierung des Anreicherungsgrades finden unterschiedliche Methoden Verwendung:

Der TSH-Radiorezeptorassay (RRA) (31,43) zielt direkt auf den Rezeptor und mißt den Zuwachs des spezifisch - also an den Rezeptor - gebundenen I^{125}-TSH im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge.

Die indirekten Methoden zum Nachweis von Plasmamembranen vergleichen Enzymmuster (12, 16), deren Aktivität eine Quantifizierung der Anreicherung der Plasmamembranen erlaubt. Elektronenoptische Darstellungsverfahren (9, 31, 55) geben durch morphologischen Vergleich Aufschluß über den Anreicherungsgrad.

Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel unserer Untersuchungen soll sein, TSH-bindendes Material mit Schilddrüsenzellmembranen anzureichern. Dieses Material hat gegenüber den durch Detergentien solubilisierten Rezeptoren den Vorteil, daß die Rezeptorstrukturen stabiler (38) sind und in ihrer physiologischen Umgebung, der Zellmembran, für spezifisch Effektor-Rezeptor-bezogene Nachweismethoden zur Verfügung stehen.

Um die Membrananreicherung zu erzielen, wollen wir verschiedene Methoden zur Reinigung von Plasmamembranen aus einem Homogenat von Schilddrüsenzellen testen. Das Resultat dieser Anreicherungsschritte wird nach spezifischer TSH-Bindung, histochemischen und morphologischen Kriterien überprüft. Die Untersuchung der Enzymverteilung, des Dichte- und Bindungsverhaltens und die Bestimmung des isoelektrischen Punktes weisen auf charakteristische Eigenschaften der Plasmamembranen hin.

Abschließend sollen die Präparationsmethoden hinsichtlich der Anreicherung und Ausbeute in TSH-Bindung und Proteingehalt verglichen werden. Das angereicherte Material soll in Untersuchun-

gen der TDA-Bindung eingesetzt werden. Wir wählten bovine Schilddrüsen als Ausgangsmaterial, da nicht pathologisch veränderte Schilddrüsen vom Rind leichter zugänglich sind als menschliches Material und zusammen mit bovinem TSH den Aufbau eines homologen Systems ermöglichen. Vorversuche mit humanen Schilddrüsen werden als abschließender Schritt angefügt.

2. Methoden und Materialien

Zur Anreicherung von Plasmamembranen aus einem Zellhomogenat lassen sich verschiedene Methoden einsetzen:

1. Ausgangsmaterial für alle weiteren Auftrennungsmethoden ist eine grobe Membranpräparation, die durch verschiedene Zentrifugierschritte hergestellt wird. Größere Verunreinigungen wie z.B. Bindegewebsfasern, Kernbestandteile oder nicht aufgebrochene Zellen werden durch eine kurze Zentrifugation bei niedriger g-Zahl sedimentiert. Der Überstand wird ultrazentrifugiert; es entsteht ein Pellet, das sich hauptsächlich aus Membranbruchteilen, Lyosomen und Mitochondrien zusammensetzt. Im Überstand bleiben lösliche Proteine, Ribosomen und Nucleinsäuren zurück. Mehrmaliges Waschen verbessert die Homogenität des Pellets(13).

2. BRUNETTE/TILL (8) beschrieben 1970 ein Zweiphasensystem aus Dextran und PEG (Polyethylenglykol) für eine schnelle und einfache Membrananreicherung. Bei diesem System wird PEG vermehrt in der oberen, Dextran vermehrt in der unteren Phase gefunden (19); die Abtrennung hängt von der Ionenzusammensetzung der Lösungen und von der Ladung des Proteins ab (51). Die Membranen reichern sich in der Interphase, der Schicht zwischen oberer und unterer Phase an, während andere Zellbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung in den Phasen verteilt bleiben. Zentrifugation beschleunigt die Phasentrennung.

3. Die isopyknische Zentrifugation über Dichtegradienten trennt Partikel nur nach ihrer Dichte auf, unabhängig von der Zentrifugierzeit. Sie ist also im Gegensatz zum Zonenzentrifugationsverfahren nach dem Sedimentationsgeschwindigkeitsprinzip eine Endpunktbestimmung. In unserem Fall wird die grobe Membranpräparation aufgetragen, ihre einzelnen Bestandteile wandern während der Zentrifugation in die für sie spezifischen Dichtebanden und bleiben dort liegen. Auch längere Zentrifu-

gierzeit kann die Bestandteile von diesen Dichtebanden nicht mehr entfernen. Die ungefähre Dichte von Plasmamembranpartikeln in Saccharoselösung liegt bei d=1,12-1,15 g/cm³, lange Bruchstücke können bei d=1,18-1,21 g/cm³ zu finden sein. Mitochondrien werden bei d=1,18-1,21 g/cm³, Lysosomen bei d=1,20-1,22 g/cm³ gefunden (13). Der Gradient muß so gewählt werden, daß er über die niedrigste und höchste Dichte hinaus geht, bei der sich erwartungsgemäß die aufzutrennenden Partikel anreichern. So werden die untersuchten Zellbestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt, Verunreinigungen werden pelletiert, bleiben an der Gradientenoberfläche oder werden über den ganzen Gradienten verstrichen.

Es kommen kontinuierliche und diskontinuierliche Gradienten zum Einsatz, die eine Substanz in verschiedenen Konzentrationen enthalten und somit ein Dichtegefälle darstellen. Ein kontinuierlicher Saccharosegradient mit Saccharosekonzentrationen von 20-50 % weight/weight (w/w) deckt einen Dichtebereich von 1,08-1,23 g/cm³ ab.

Die Dichtemessung wird mit einem Refraktometer durchgeführt, in dem 20 µl proteinfreie Probe aufgetragen und der abgelesene Wert anhand einer Tabelle (15) in Dichte (g/cm³) umgerechnet wird.

4. Die isoelektrische Fokussierung basiert auf folgendem Prinzip (25):

Durch Anlegen hoher Spannung wird in einer Lösung aus Trägerampholyten ein pH-Gradient ausgebildet. Die Trägerampholyte sind aliphatische Polyamino-Polycarboxylsäuren; sie unterscheiden sich in ihren pI-Werten voneinander, die gleichmäßig über das gewählte pH-Spektrum verteilt sind. Im elektrischen Feld wandern die Ampholyte an ihren isoelektrischen Punkt und bilden so einen pH-Gradienten. Die aufzutrennenden Partikel werden dem Dichtegradienten zugegeben, der das System gegen Konvektion stabilisiert. Die Elektrodenlösungen schützen die Ampholyte vor anodischer Oxidation bzw. kathodischer Reduktion.

Die aufzutrennenden Partikel liegen im pH-Gradienten ur-

sprünglich in ionisierter Form vor und bewegen sich solange im elektrischen Feld, bis der Ladungsausgleich erfolgt. Dieses Gleichgewicht aus positiven und negativen Ladungen wird am isoelektrischen Punkt des Partikels erreicht. Der Partikel ist dann nach außen ungeladen und wandert nicht mehr im elektrischen Feld.

Die Methode wird für Membranen meist als Charakterisierungsschritt angewandt. Wir versuchen, eine präparative Auftrennung der groben Membranpräparation nach den unterschiedlichen isoelektrischen Punkten ihrer Bestandteile zu erzielen.

2.1. Grobe Präparation von Plasmamembranen boviner und humaner Schilddrüsen

2.1.1. Standardpräparation

Material:

Homogenisierungspuffer (Puffer A):
Tris(hydroxymethyl)Aminomethan 10 mM, Art. 8382, pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt, Puffereinstellung auf pH 7,4 mit rauchender HCl (min. 37 %, Art. 317, Fa. Merck, Darmstadt)

Hettich Roto Silent K-Kühlzentrifuge

Beckman Spinco Typ L 50, Rotor Typ 30

Warring Commercial Blender (Star Mix)

Ultra-Turrax-Homogenisierer

Polytron PT 10/35, Kinematica GmbH, Kriens/Luzern

Nylonseidegaze mit einer Porengröße von 80 und 200 µm

Pasteurpipetten kurz (150 mm) Fa. Assistent, Nr. 567/1

Stadie-Riggs-microtome

Frische Kälberschilddrüsen werden vom Schlachthof München geholt, menschliches Schilddrüsengewebe stammt aus Strumaresektionsmaterial. Alle Präparations- und weiteren Auftrennungsschritte finden bei 0-4 °C statt.

Die Schilddrüsen werden im eisgekühlten Homogenisierungspuffer A transportiert, gewaschen, von angrenzendem Muskel-, Fett- und Bindegewebe befreit und bei -70 °C tiefgefroren. Zur Weiterverarbeitung wird das Gewebe in eisgekühltem Puffer A aufgetaut, Kapsel und Bindegewebe abpräpariert und der Gewebeblock mit dem Stadie-Riggs-microtome in Scheiben von weniger als 1 mm Dicke geschnitten. Die Gewebescheiben werden mit Puffer A auf das 2-4-fache ihres Ausgangsgewichts gebracht, gewogen und mit einer Schere in kleine Stückchen zerschnitten.

Das Gewebe wird fraktioniert, im kalten Warring Commercial Blender je 5 sec. (13) bei Stufe low grob aufgeschlossen, das Gerät mit 2 x 10 ml Puffer A je 5 sec. nachgespült und der Gewebebrei fraktioniert im Polytron (54) auf Stufe 4 je 5 sec. fein homogenisiert. Eine Saugflasche filtert das Homogenat über Nylonseidengaze mit einer Porengröße von 200 µm. Das im Filter hängengebliebene Gewebe wird nochmals homogenisiert und über die 200 µm-Seidengaze abgefiltert. Der Trichter wird mit 5 ml Puffer A nachgespült, um hängengebliebenes Schilddrüsengewebe abzuwaschen. Das gesamte Filtrat wird für 10 min. bei 500 g in einer Hettich-Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand aus der Zentrifugation wird mit Hilfe einer Saugflasche über 80 µm-Seidengaze gefiltert, der Trichter wieder mit 5 ml Puffer A nachgespült und das Filtrat in Beckman Polykarbonatröhrchen 15 min. bei 20000 g in der Beckman Spinco Ultrazentrifuge mit dem Rotor Typ 30 zentrifugiert. Die entstandenen Pellets werden durch Aufsaugen und Wiederausstoßen mit einer Pasteurpipette in 1 ml Puffer A resuspendiert, nachdem der Überstand verworfen und die Gefäßinnenwand von anhaftendem fettigem Material gereinigt worden ist. Das resuspendierte Pellet wird mit 15 ml Puffer A verdünnt, geschüttelt und wieder 15 min. bei 20000 g zentrifugiert. Das Pellet wird wie zuvor resuspendiert, verdünnt und nochmals bei 20000 g zentri-

fugiert.

Das Resuspensionsvolumen wird mit Puffer A verdünnt, so daß 1 ml drei Gramm des Ausgangsgewichts des Schilddrüsengewebes entspricht, d.h. 3 g Schilddrüsengewichtsäquivalente (SDequ)/ml.

2.1.2. Vorversuche zur Standardpräparation

Am Anfang führten wir die grobe Präparation ohne das nochmalige Homogenisieren und Filtern des im Filter hängengebliebenen Gewebes durch. Um die Ausbeute zu steigern, wechselten wir zu oben beschriebener Methode. Auch wurden Versuche mit unterschiedlichen g-Zahlen bei der Ultrazentrifugation gemacht, wir blieben jedoch bei 20000 g (siehe 3.1.1.).

Neben dem hypotonen Homogenisierungspuffer testeten wir auch die Präparation im isotonen Medium (Puffer B: 10 mM Tris HCl pH 7,4 + 0,32 M Sacharose) bei sonst gleichem Ablauf. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch, daß die hypotone Präparation die vorteilhaftere war (siehe 3.1.2.).

Das menschliche Struma-Resektionsmaterial war meist stark mit Knoten, Bindegewebssträngen und Zysten durchsetzt. Im Vergleich dazu waren die Kälberschilddrüsen im wesentlichen unverändert.

Bei Verarbeitung von frischen, nicht tiefgefrorenen Schilddrüsen verklebte das Material beim Resuspendieren oft zu Fäden, was das Wiederauflösen des Pellets etwas erschwerte. Am besten waren einmal tiefgefrorene Schilddrüsen zu verarbeiten.

2.2. Auftrennung der groben Präparation über das Zweiphasensystem

2.2.1. Auftrennung der groben Membranpräparation über ein modifiziertes Zweiphasensystem nach BRUNETTE/TILL (8)

Das Zweiphasensystem setzt sich aus folgenden Lösungen zusammen:

100 g 20 %iges (w/w) Dextran T 500 (Bestell-Nr. 2681, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) in bidestilliertem Wasser,

51,5 g 30 %iges (w/w) PEG-6000 (Fa. Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) in bidestilliertem Wasser,

49,5 ml Aqua bidest.,

166,5 ml 0,22 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5 (NaH_2PO_4 Art. 6346, p.a., Fa. Merck, Darmstadt, Na_2HPO_4 Art. 6580, p.a., Fa. Merck, Darmstadt) und

40 ml 0,01 M $MgCl_2$ (Art. 5833, p.a., Fa. Merck, Darmstadt) in bidest. Wasser.

Diese Lösungen werden in einen Scheidetrichter gegeben, durch Schütteln gut durchmischt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag haben sich zwei Phasen getrennt, die man getrennt abläßt, die Interphase wird verworfen. Da die Phasentrennung des beschriebenen Zweiphasensystems nur erfolgt, wenn der Wasseranteil konstant gehalten wird, wird die grobe Membranpräparation zur Verminderung des Wassergehalts vor dem Auftragen 15 min. bei 20000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird dann in 1 ml der oberen Phase resuspendiert. 9 ml der oberen und 10 ml der unteren Phase werden zugegeben, das Gemisch kräftig geschüttelt und 15 min. bei 1000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Danach wird der größte Teil der oberen Phase abgesaugt und die Proteinschicht, die sich in der Interphase abgelagert hat, mit einer Pasteurpipette isoliert, in ein neues Röhrchen gegeben und mit je 10 ml der oberen und unteren Phase vermischt.

Das entstandene Pellet kann in Puffer A resuspendiert und nach zweimaligem Waschen (siehe oben) zu Bindungsstudien verwendet werden.

Auch das neue Zweiphasensystem wird 15 min. bei 1000 g zentrifugiert. Die obere Phase wird verworfen, die Interphase isoliert, mit 10 ml Puffer A verdünnt und 15 min. bei 22000 g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird verworfen, das Pellet in 1 ml Puffer A resuspendiert, mit 9 ml Puffer A verdünnt und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wird wie die eingesetzte grobe Präparation resuspendiert, d.h. wieder auf 3 g Schilddrüsenäquivalent pro ml (gSDequ/ml) gebracht. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

2.2.2. Vorversuche mit dem Zweiphasensystem

Bei den Vorversuchen verwendeten wir PEG-6000 der Fa. Merck, Darmstadt (Artikel-Nr. 807491, zur Synthese), womit keine oder nur sehr mangelhafte und instabile Phasentrennung eintrat, so daß man das System nicht schütteln durfte, sondern die untere Phase vorsichtig unterschichten mußte. Erst das PEG der Fa. Diagnostic Products brachte die gewünschte Stabilität. Statt 0,01 M $ZnCl_2$ wie BRUNETTE/TILL (8) oder Aqua dest. wie LESKO et al. (24) verwendeten wir 0,01 M $MgCl_2$, da wir damit eine bessere Phasentrennung erreichten.

Da wir mittels der Proteinbestimmung in Interphase und Pellet nur einen Teil des eingesetzten Proteins wiederfanden (siehe 3.2.1.), versuchten wir diesen Ausbeuteverlust zu klären:

Wir verdünnten jeweils 3 ml der oberen und unteren Phase mit ca. 22 ml Puffer A und zentrifugierten 60 min. bei 22000 g (Rotor 30). Die Pellets, die teilweise nur sehr schwach am Röhrchen hafteten, wurden nochmals in 10 ml Puffer A resuspendiert, 15 min. bei 22000 g abzentrifugiert und der Proteinmessung unterzogen.

2.3 Auftrennung durch isopyknische Zentrifugation im Dichtegradienten

2.3.1. Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten

Der erste Schritt war die Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten, um genau die Dichtebanden zu ermitteln, bei denen sich Protein anreichert.

2.3.1.1. Der kontinuierliche Saccharosegradient

Material:

LKB Gradientenmischer mit Rührspatel
Ismatec Pumpe mp-25
Beckman L5-50-Ultrazentrifuge mit Rotor SW 27
Fraktionssammler Serva Linear II mit Steuereinheit
LKB Uvicord 4107 A optical und control unit
Cenco Gradient Former

Zur Applikation der Gradientenlösungen in Beckman-Zellulosenitratröhrchen (s. Abb. 1 a) werden die hohlen Metallnadeln fast am Boden aufgesetzt. Im ausflußnahen Gefäß des Gradientenmischers befinden sich 100 ml 20 %ige (w/w) Saccharoselösung und ein elektrischer Rührstab, im anderen Gefäß 100 ml 50 %ige (w/w) Saccharose, gelöst in Puffer A. Unter ständiger Durchmischung wird nun der Gradientenmischer langsam mit einer Peristaltikpumpe geleert und der sich ausbildende Dichtegradient in die Röhrchen gepumpt. In den Röhrchen findet sich also ganz unten 50 %ige, ganz oben 20 %ige Saccharose.

400 - 600 µl der groben Präparation, die in wässriger Lösung vorliegt, werden auf 20 % Saccharosegehalt gebracht und vorsichtig oben auf den Gradienten aufgetragen. In ein Röhrchen wird kein Protein aufgetragen, es dient als Kontrolle der Linearität des Gradienten. Mit 20 %iger Saccharoselösung wird

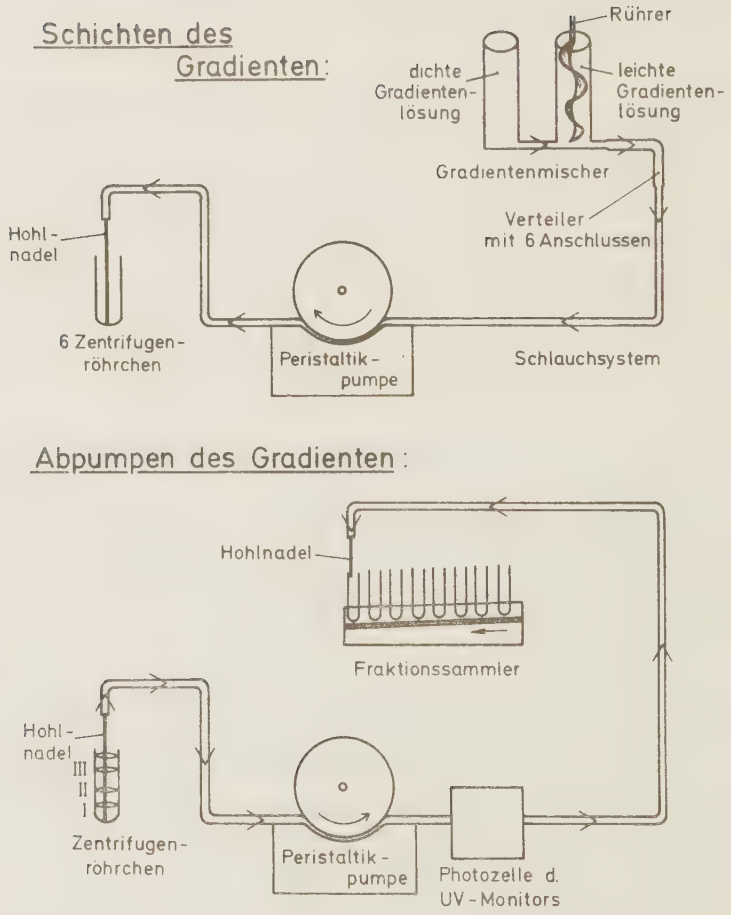


Abbildung 1 a: Aufbau eines Systems zur Auftragung von Dichtegradienten: Im Gradientenmischer werden die Gradientenlösungen vermischt. Die Gradientenlösung wird durch 6 Schläuche in 6 Zentrifugenröhrchen gepumpt. Es entstehen 6 identische Dichtegradienten.

jedes Röhrchen schließlich austariert, da beim Schichten doch nicht ganz exakt gleiche Volumina in die Röhrchen gepumpt werden und der Rotor dadurch ungleichmäßig belastet würde. Die Röhrchen werden dann behutsam in einen Beckman SW 27 swinging bucket Rotor eingehängt und zwei Stunden bei 67000 g in der Beckman L 5-50 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach diesen zwei Stunden kreiselt der Rotor ohne Bremse langsam aus.

Die Röhrchen werden vorsichtig in die Halterung zurückgesetzt, die hohlen Metallnadeln des Absaugsystems behutsam bis zum Boden der Röhrchen abgesenkt, die Ismatec-Pumpe entleert die Röhrchen dann im Rückwärtslauf (s. Abb. 1 b). Der Inhalt von zwei der Röhrchen durchläuft beim Abpumpen UV-Monitore (LKB Uvicord), die bei 254 nm die Eigenextinktion von Protein messen.

Alle sechs Gradienten werden beim Absaugen durch den Serva-Linear II-Fraktionssammler mit einem Wechselintervall von 240 sec. in je 14 - 18 Fraktionen aufgeteilt. Gleiche Fraktionen der sechs Gradienten enthalten den selben Dichtebereich. Fünf Fraktionsreihen sind proteinhaltig, die Proteingipfel liegen in jedem Gradienten bei der gleichen Dichte vor, d.h. sie finden sich in den selben Fraktionen. Diese Fraktionen werden miteinander gepoolt, um den Peak zu isolieren. Zusätzlich können auch die gleichen Peaks der einzelnen Gradienten miteinander gepoolt werden. Die Fraktionen, die kein Protein enthalten, werden verworfen.

Abbildung 1 b: Aufbau eines Systems zum Abpumpen und Fraktionieren von Dichtegradienten: In jeden der sechs Gradienten wird eine Hohlnadel vorsichtig abgesenkt. Die Gradienten werden abgepumpt, der Proteingehalt von zwei Gradienten durch den UV-Monitor aufgezeichnet. Durch den Fraktionssammler wird jeder Gradient in 14-18 Fraktionen aufgetrennt. Es entstehen sechs Fraktionsreihen, in denen die Fraktionen, die in den Reihenfolgen an gleicher Stelle stehen, den gleichen Dichtebereich der Gradienten enthalten.

Die sechste Fraktionsreihe wird der refraktometrischen Dichtebestimmung unterzogen.

Die Fraktionen werden einzeln oder gepoolt mit je 10 - 20 ml Puffer A soweit verdünnt, daß sich das Protein trotz des saccharosehaltigen Mediums abzentrifugieren läßt. Der erste Zentrifugationsschritt ist 22000 g für 15 min. beim Rotor 30, 20 min. beim Rotor 21 (wegen der langsameren Beschleunigung des schwereren Rotors), für den zweiten Schritt in nur noch 10 ml Puffer A werden 15 min. bei 22000 g angesetzt. Danach wird das Zentrifugat in je 400 µl Puffer A resuspendiert.

Pellets, die in den Gradientenröhrchen zurückbleiben, werden in 400 µl Puffer A aufgelöst, anschließend wie oben gewaschen und in Puffer A resuspendiert.

Die gereinigten Fraktionen werden bei -70°C eingefroren.

2.3.1.2. Vorversuche und Veränderungen des Versuchsablaufs

Anfänglich wurde die grobe Präparation mit 70 %iger Saccharose in Puffer A auf einen Saccharosegehalt von 50 % gebracht, auf den Boden des Röhrchens gegeben und der Gradient darübergeschichtet. Ein direkter Vergleich der beiden Auftragungsmethoden zeigte, daß der von oben mit Protein beschickte Gradient eine etwas schärfere Trennung der Banden ergibt (siehe 3.3.2.).

Auch der Dichtebereich des Gradienten war Gegenstand von Versuchen. Wir experimentierten mit Saccharosekonzentrationen von 50 bis 30 %, 40 bis 20 % und 50 bis 20 %; beim letzten Konzentrationsbereich trennten sich die drei Hauptkomponenten der groben Präparation am deutlichsten, bei den übrigen Gradienten zeigten sich zumeist nur zwei Peaks. Die Saccharosekonzentration wird bei den jeweiligen Versuchen in weight/weight (w/w) angegeben.

Beim Schichten der ersten Gradienten wurde die Auftragungsnadel von Hand dem Flüssigkeitsspiegel im Röhrchen nachgeführt. Dabei lief als erstes die dichtere Lösung ins Röhrchen und am Schluß wurde ganz oben die am wenigsten dichte Lösung geschichtet. Da wir beim Absaugen den Gradienten mit der Absaugnadel durchstechen mußten, und die Dichtebestimmung mit dem Refraktometer einwandfrei lineare Gradienten ergab, schlossen wir daraus, daß die entstehenden Turbulenzen bei entsprechender Vorsicht keine meßbare Verschleppung bewirken. Um das Schichten einfacher zu machen, setzten wir die Nadel auf den Boden des Röhrchens, statt sie nachzuführen. Die zuerst geschichtete leichtere Lösung wird von der immer dichter werdenden Flüssigkeit nach oben verdrängt. Die Ergebnisse der Dichtemessung zeigen, daß die Methode unveränderte Resultate bei einfacherer Handhabung liefert.

2.3.1.3. Inkubationsversuch mit J^{125}-TSH

Zur Kontrolle des Verlustes an TSH-bindendem Material wird in diesem Versuch die grobe Membranpräparation vor der Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten mit J^{125}-TSH inkubiert. Es soll festgestellt werden, wieviel des eingesetzten J^{125}-TSH an pelletierbares Material gebunden ist, mit welchem Proteinpeak das radioaktive TSH hauptsächlich assoziiert ist und wieviel im Überstand, eventuell gebunden an nicht-pelletierbares Material zurückbleibt. Auch das Dichteverhalten von reinem J^{125}-TSH und reinem NaJ^{125} soll geprüft werden.

400 µl grobe Membranpräparation und 200 µl J^{125}-TSH (siehe 2.5.) werden 60 min. bei 37°C im Schüttelbad inkubiert und auf 20 % Saccharosegehalt eingestellt. Die Gesamtaktivität wird bestimmt. Die Probe wird auf einen 20 - 50 %igen (w/w) Zuckergradienten (siehe 2.3.1.1.) aufgetragen. Als Kontrolle wird reines J^{125}-TSH und 1:100 verdünntes NaJ^{125} (siehe 2.5.) in 20 %iger Saccharoselösung auf je einen Gradienten aufgetragen. Der weitere Ablauf wurde bereits oben (siehe 2.3.1.1.) beschrieben.

Nach dem Absaugen des Gradienten wird die Aktivität der einzelnen Fraktionen mit dem 16-Proben-Gammazähler bestimmt. Die protein- bzw. aktivitätsreichen Fraktionen werden wie bei 2.3.1.1. gepoolt, so daß die Fraktionen je eines Protein- bzw. Aktivitätspeaks vereinigt werden. Verdünnt mit Puffer A werden die gepoolten Fraktionen 45 min. bei 22000 g zentrifugiert. Die Pellets werden in 1 ml Puffer A resuspendiert und die Restaktivität im Gammazähler bestimmt, um die proteingebundene Aktivität zu ermitteln. Der Proteingehalt wird nach dem Abzentrifugieren mit der Bio-rad-Methode (siehe 2.7.2.) bestimmt.

2.3.2. Auftrennung über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (54, 55)

2.3.2.1. Auftrennung der groben Membranpräparation

Entsprechend den Ergebnissen des kontinuierlichen Gradienten (siehe 3.3.2.) wählten wir für den diskontinuierlichen Saccharosegradienten folgende Stufen:

52, 44, 35, 26 % (w/w) Saccharose, gelöst in Puffer A.

50 ml der 52 %igen Lösung werden zu gleichen Teilen in sechs Röhrchen gepumpt, dann jeweils die gleiche Menge der drei leichteren Lösungen vorsichtig darüber geschichtet. 400 µl der groben Membranpräparation werden mit 400 µl 52 %iger Saccharose auf 26 % Saccharosegehalt gebracht und vorsichtig oben aufgetragen. Die Gradienten werden mit 26 %iger Saccharose austariert, 120 min. bei 67000 g zentrifugiert, abgesaugt und fraktioniert (siehe 2.3.1.1.). Die Proteinverteilung in zwei der Gradienten wird durch UV-Monitore registriert. Jeweils zwei bis drei der proteinhaltigen Fraktionen werden gepoolt (siehe 2.3.1.1.), mit ca. 50 ml Puffer A aufgefüllt und 20 min. bei 22000 g zentrifugiert.

Die resultierenden Pellets der entsprechenden Fraktionen der identischen Gradienten werden zusammengegeben, mit ca. 20 ml

Puffer A verdünnt und 15 min. bei 22000 g abzentrifugiert. Diese Pellets werden in 400 µl Puffer A resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

Anfänglich wurde das Protein auch unten aufgetragen und der Gradient darübergeschichtet. Da beim kontinuierlichen Gradienten die Versuche, bei denen die Applikation oben erfolgte, bessere Auftrennung lieferten (siehe 2.3.1.2. und 3.3.2.), übernahmen wir die Methode auch für Stufengradienten.

2.3.2.2. Auftrennung des im Zweiphasensystem vorgereinigten Materials über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten

Wie unter 2.2.1. beschrieben, wird die grobe Membranpräparation über das Zweiphasensystem aufgetrennt. In der Interphase angereichertes Protein wird zweimal gewaschen, auf 26 % (w/w) Saccharosegehalt gebracht und auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (siehe 2.3.2.1.) aufgetragen.

2.3.3. Dichtegradienten mit Metrizamide (50)

Material:
Metrizamide, Nyegaard und Co. A.S., Oslo, Norwegen
Geräte wie unter 2.3.1.1.

Metrizamide ist der Handelsname für 2-(3-Acetamido-5-N-Methylacetamido-2,4,6 Trijodobenzamido)-2-Deoxy-D-Glucose.

Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 789, eine Dichte von 2,17 g/cm³, trägt keine Ladungen, ist sehr gut wasserlöslich und hat ihr Absorbtionsmaximum bei 242 nm. Bei Lichteinfall können sich Jodatome abspalten (40).
Aus 20 und 40 %iger (w/w)-Metrizamidelösung wird ein kontinuierlicher Gradient gebildet, wie unter 2.3.1.1. beschrieben. 400 µl grobe Membranpräparation werden mit 400 µl 40 %iger Lö-

sung auf 20 % Metrizamidegehalt gebracht, die Röhrchen mit 20 %iger Lösung austariert und wie bei 2.3.1.1. zentrifugiert. Danach wird der Gradient abgesaugt. Der Proteingehalt der Fraktionen wird mit dem Bio-rad-Proteinassay bestimmt, einzeln mit 23 ml Puffer A aufgefüllt und 15 min. bei 22000 g (Rotor 30) zentrifugiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wird das Pellet in 400 µl Puffer A resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

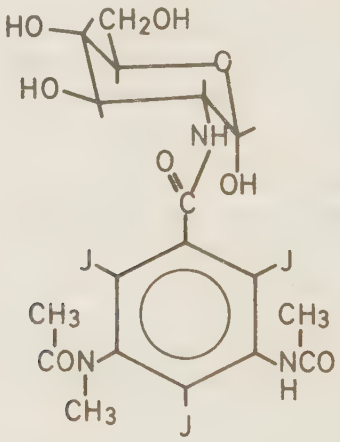


Abbildung 2: Strukturformel von Metrizamide
(2-(3-Acetamido-5-N-Methylacetamido-2,4,6 Trijodobenzamido)-2-Deoxy-D-Glucose)

2.4. Auftrennung durch präparative isoelektrische Fokussierung (25)

2.4.1. Isoelektrische Fokussierung mit Glyzerin-Gradienten

Material:

LKB 8101 Elektrofokussiersäule 110 ml

LKB 2103 Power Supply

LKB 8121 Gradientenmischer

LKB 4701 A Uvicord I

LKB 6520-7/8 Schreiber

Ismatec 13 canal micro pump

LKB 2112 Redirac Fraktionssammler
Serva UKT 2 Kühlbad
pH-Meßgerät WTW pH Digi 510

Servalyt pH 4-9 T, Fa. Serva Nr. 42910

Abbott VP bichromatic analyzer (Analysenautomat)

Glyzerin 87 %, p.a., Nr. 4094, Fa. Merck, Darmstadt.

Die Gradientenlösungen werden hergestellt (52):

Die dichte Gradientenlösung besteht aus 30 ml 87 %-igem Glyzerin, 21,575 ml aqua dest., 2,025 ml des Ampholyten und 400 µl grober Membranpräparation. Die Endkonzentration entspricht einer 60 %-igen Glyzerinlösung.

Die leichte Gradientenlösung besteht aus 52,925 ml aqua dest., 0,675 ml Ampholyt und 400 µl grober Präparation.

Die Anodenflüssigkeit setzt sich aus 15 g Saccharose, 12 ml aqua dest. und 4 ml 1 M H_3PO_4 zusammen, die Kathodenflüssigkeit aus 5 ml 1 M NaOH und 15 ml aqua dest..

Die Anode wird unten, die Kathode oben angelegt, um den Protein-Hauptpeak beim Ablassen nicht zu verstreichen. Die Kühlung der Säule wird eingeschaltet und das Elektrodenventil geöffnet. Mit der peristaltischen Pumpe wird die Anodenlösung aufgetragen,

dabei ist der Auslauf kurz zu öffnen, um Luftblasen abzulassen. Dann wird der Dichtegradient von unten nach oben vorsichtig bis ca. 1 cm unter die obere Elektrode überschichtet und die Kathodenlösung appliziert. Das Steuergerät wird auf maximal 1000 V, 2 Watt und 12,5 mA eingestellt. Die Leistungsbegrenzung wird im Laufe der Fokussierung auf 3 Watt erhöht. Nach ca. 15 bis 18 Stunden sinkt die Stromstärke nicht weiter ab, das Elektrodenventil kann geschlossen, die Anodenflüssigkeit abgesaugt und der Säuleninhalt über einen UV-Monitor mit Schreiber abgepumpt werden. Ein Fraktionssammler mit einem Wechselintervall von zwei Minuten fängt die Flüssigkeit auf. Die pH-Werte der ca. 100 einzelnen Fraktionen werden gemessen und die Glyzerinkonzentrationen mit dem Abbott-VP bestimmt. Die Fraktionen der einzelnen Protein-Peaks werden gepoolt, je fünf Fraktionen mit ca. 40 ml Puffer A verdünnt und 20 Minuten bei 22 000 g zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen wird das Pellet in 400 µl Puffer A resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

2.4.2. Isoelektrische Fokussierung mit Saccharosegradienten (52)

Die Dichtegradientenlösung besteht aus 27 g Saccharose, 1,35 ml Ampholyt, 0,8 ml grober Präparation und aqua dest. ad 54 ml, die leichte aus 2,7 g Saccharose, 1,35 ml Ampholyt, 0,8 ml grober Präparation und aqua dest. ad 54 ml.

Die Konzentrationen entsprechen 50 bzw. 5 % (w/v). Da in diesem Vorversuch die Säule anders gepolt worden war als im Glyzeringradienten, benutzten wir folgende Elektrodenlösungen:

Anodenflüssigkeit: 3 ml 1 M H_3PO_4 und 17 ml aqua dest.

Kathodenflüssigkeit: 15 g Saccharose, 10 ml aqua dest. und 6 ml 1 M NaOH.

Der Ablauf entspricht dem in 2.4.1.. Da bei diesem Dichte- und pH-Gradienten das Protein in einem dicken Ring ausflockte, der beim Abpumpen verschleppt worden wäre, wurden die proteinhaltigen Fraktionen von Hand abgelassen. Diese Ausflockung konnte durch Polungsumkehr und Verwendung von Glyzerin als Gradientenmedium weitgehend vermieden werden.

2.5. J^{125}-Markierung und Membranreinigung von bovinem TSH

Material:

Sephadex G-50-Säule

Sephadex G-100-Säule

NaJ^{125}, Fa. Amersham Buchler GmbH, Braunschweig

hochgereinigtes bovines TSH (zur Verfügung gestellt von Dr. Pierce)

Beckman L5-50 Ultrazentrifuge

Rotor Ti 50

Tracerlab Gamma/Guard 150

bovines Serumalbumin reinst, Nr. ORHD 20/21, Fa. Behring

Chloramin T, p.a., Artikel 2426, Fa. Merck, Darmstadt

Natriumdisulfit, p.a. Art. 6528, Fa., Merck, Darmstadt

2,5 µg hochgereinigtes bovines TSH werden durch Chloramin T oder Lactoperoxydase mit J^{125} (1 mCu) markiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumdisulfit gestoppt, das Markierungsgemisch auf die G-50-Säule aufgetragen und mit 20 mM Tris HCl pH 7,4 plus 1 % bovines Serumalbumin (bSA) eluiert. Der TSH-Peak wird aufgefangen, gepoolt und der Membranreinigung nach SMITH/HALL (43, 44) unterzogen, um J^{125}-TSH zu erhalten, das die Fähigkeit zur spezifischen Bindung an den TSH-Rezeptor besitzt:

2 ml der groben bovinen Schilddrüsenmembranpräparation werden mit dem markierten TSH 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wird 10 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet zweimal in 6 ml 20 mM Tris HCl pH 7,4 + 0,1 % bSA resuspendiert und 10 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wird wiederholt. Danach wird das Pellet in 2 ml 2 M NaCl in 20 mM Tris HCl pH 7,4 + 0,1 % bSA resuspendiert und 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt um das J^{125}-TSH wieder von den Rezeptoren zu lösen. Das Gemisch wird 60 Minuten bei 120 000 g zentrifugiert, der Überstand auf die

G-100-Säule gegeben, das markierte TSH eluiert, die Aktivität bestimmt und das "Membran-gereinigte" radioaktive TSH gepoolt.

2.6. Der Radiorezeptorassay (RRA) für TSH

Material:

Puffer C: 20 mM Tris HCl pH 7,4 plus 0,25 bovines Serumalbumin (reinst, Nr. ORHD 20/21, Fa. Behring)

Bovines IgG, Gammaglobulin aus Rinderserum, lyophilisiert, rein, ca. 98 %, Nr. 22550, Fa. Serva, Heidelberg

PEG-6000, zur Synthese, Art. 807491, Fa. Merck-Schuchardt

Schüttelwasserbad Köttermann 3047

Thyreostimulin TSH, Fa. Organon Teknika, Oberschleißheim

Thyratrop, Fa. Ferring-Arzneimittel

Eppendorf-Zentrifuge 5413

16-Proben-Zähler Nuklear Enterprise NE 1600

2.6.1. Die Inkubation

Der Ansatz zur Bestimmung der TSH-Gesamtbindung besteht in der Regel aus 50 µl Probe (z.B. einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Materials) und 100 µl Puffer C (siehe 2.6.). Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung, d.h. der Anlagerung von TSH an andere Strukturen als den TSH-Rezeptor, werden zu 50 µl Probe 100 µl Thyreostimulin (5 U TSH/ml) gegeben.

Das Gemisch wird 10 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dieser Vorinkubation werden 50 µl Membran-gereinigtes J^{125}-TSH (siehe 2.5.) zugegeben und der Ansatz 60 Minuten wie oben inkubiert.

2.6.2. Trennung von Membran-gebundenem und freiem Material

Zum Ansatz (siehe 2.6.1.) werden nach Ende der Inkubation
entweder 500 µl 0,3 %-ige Gammaglobulinlösung in 20 mM Tris HCl und 700 µl 5 %-iges PEG-6000 in 20 mM TrisHCl pH 7,4 (B/F-Trennung durch PEG-Fällung)
oder 1 ml Puffer C (B/F-Trennung durch reine Zentrifugation)

gegeben. Das Membranprotein wird in beiden Fällen durch 15-minütiges Zentrifugieren in gekühlten Einsätzen in der Eppendorf-Zentrifuge (8800 g) pelletiert. Die vollen Röhrchen werden 2 Minuten im 16-Proben-Zähler zur Bestimmung der Gesamtaktivität gezählt, der Überstand wird abgesaugt und die Aktivität im Pellet nochmals 10 Minuten im gleichen Gerät gemessen.

Die Differenz aus Gesamtbindung (ausgedrückt in Prozent der Gesamtaktivität) und unspezifischer Bindung ergibt den Wert der spezifischen Bindung.

2.6.3. Vergleich zwischen B/F-Trennung durch PEG-Fällung und reiner Zentrifugation

Abbildung 3 zeigt den Vergleich der Bindungskurven der gleichen groben Membranpräparation nach B/F-Trennung durch PEG-Fällung und reiner Zentrifugation.

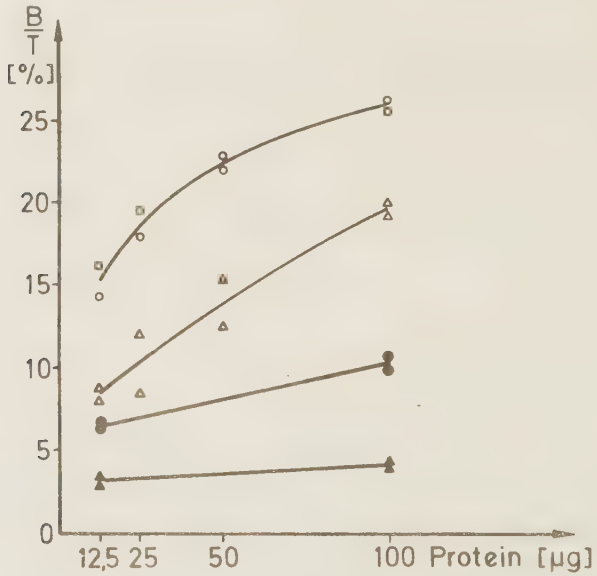


Abbildung 3: Vergleich der Bindungskurven der gleichen groben Membranpräparation nach B/F-Trennung durch PEG-Fällung bzw. durch Zentrifugation.

- ○ B/F-Trennung durch PEG-Fällung - Gesamtbindung
- ● B/F-Trennung durch PEG-Fällung - unspezifische Bindung
- △ B/F-Trennung durch Zentrifugation - Gesamtbindung
- ▲ B/F-Trennung durch Zentrifugation - unspezifische Bindung

Dabei zeigte sich, daß bei der PEG-Fällung die TSH-Gesamtbindung zwar höhere Werte aufweist, daß die unspezifische Bindung aber um fast den gleichen Betrag (4-7 %) erhöht ist. Das heißt also, man kann die reine Zentrifugation zur B/F-Trennung ohne Nachteil verwenden.

2.6.4. Verdrängungskurven mit TSH

Die reinen TSH-Eichkurven wurden mit Puffer C angesetzt. Als Vorbereitung zur Messung von TDA in γ-Globulinpräparationen muß isotonische Kochsalzlösung verwendet werden, um die γ--Globuline in Lösung zu halten. Da NaCl die TSH-Bindung an Membranprotein beeinflußt (2,48) muß die TSH-Vergleichseichkurve für die TDA-Messung ebenfalls in 0,9 % NaCl angesetzt werden.

Um die Vergleichbarkeit der Verdrängungskurven zu erreichen, werden die Proteinkonzentrationen der eingesetzten Proben nach einer vorausgegangenen Bindungsstudie so gewählt, daß der Ausgangswert der Gesamtbindung (B_0) in den zu vergleichenden Verdrängungskurven gleich ist.

Ansatz der Verdrängungskurven:

100 µl Probe (verdünnt auf die erforderliche Proteinkonzentration)

\+ 50 µl 0,9 % NaCl bzw. Puffer C (für den Ausgangswert B_0)

oder

einer TSH-Verdünnungsreihe (0,007-250 mE Thyratrop pro ml Endvolumen, für die eigentliche Verdrängungskurve)

oder

Thyreostimulin (10 IE/ml für die unspezifische Bindung)

Der weitere Ablauf ist wie bei 2.6.1. und 2.6.2..

2.7. Proteinbestimmungen

2.7.1. Methode nach LOWRY

Material:

Bovines Serumalbumin, reinst, Nr. ORHD 20/21, Fa. Behring

Moni-trol 1, Fa. Merz und Dade, Abt. der American Hospital Supply Deutschland GmbH, München

Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS), reinst, Nr. 20760, Fa. Serva, Heidelberg

Folin-Ciocalteus Phenolreagens, Art. 9001, Fa. Serva, Heidelberg

Eppendorf-Photometer mit Hg 578 nm-Filter

Lösung D: 49,0 ml 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH, Art. 6392, Fa. Merck, Darmstadt

0,5 ml 0,5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in H_2O, Art. 2790, Fa. Merck, Darmstadt

0,5 ml 1,5 % Na-K-Tartrat in H_2O, Art. 8087, p.a., Fa. Merck, Darmstadt

2,5 ml 10 % SDS in H_2O

Zur Bestimmung des Proteingehalts unserer Präparationen wird ein modifizierter LOWRY-Test (26) verwendet. Das Detergens SDS wurde zur Originalmethode hinzugefügt, um die Membranproteine in Lösung zu halten (39).

Die Lösung D wird in obiger Zusammensetzung frisch hergestellt. Die Einzellösungen können bis auf die SDS-Lösung längere Zeit bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Ein Eichstandard aus bovinem Serumalbumin wird auf 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,0625 mg Protein/ml mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Der Serumstandard Moni-trol 1 (Zusammensetzung wie normales Humanserum) wird mit 0,9 % NaCl auf 0,1 und 0,05 g/dl Protein (entspricht 1 mg/ml bzw. 0,5 mg/ml) gebracht. Das Folin-Ciocalteus Phenolreagens wird mit aqua dest. im Verhältnis 1:2 verdünnt. Dann wird in jede Küvette 50 µl Probe pipettiert, 1 ml Lösung D zugegeben und das Gemisch genau 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach werden 100 µl Folin 1:2 zugegeben und gut durchmischt. Nach 40 Minuten bei Zimmertemperatur kann der Ansatz bei 578 nm im Eppendorf-Photometer gemessen werden. Die Farbreaktion ist länger als eine Stunde stabil. Proben, deren Extinktionswerte außerhalb der Eichkurve liegen, müssen verdünnt und neu angesetzt werden. Ein Blindwert wird mitgemessen, alle Proteinbestimmungen werden als Doppelwerte ausgeführt.

Die Eichpunkte liegen im Meßbereich auf einer Geraden (s.Abb.4).

Die Kontrollseren ergeben Abweichungen von 0,082 mg/ml beim 0,1 g/dl-Wert und 0,041 mg/ml beim 0,05 g/dl-Wert.

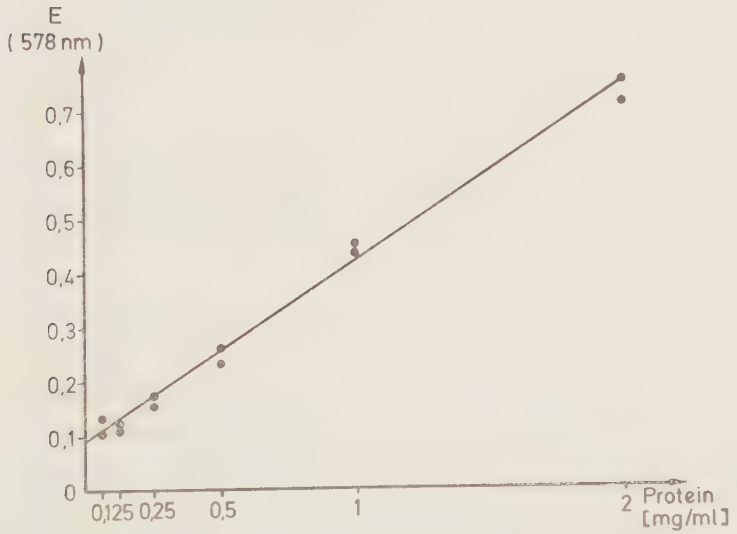


Abbildung 4: Eichgerade der Proteinbestimmungsmethode nach LOWRY
Eichbereich zwischen 0,0625 und 2mg Protein/ml
● Doppelwerte der Extinktion E der Eichlösungen bei 578 nm.

2.7.2. Bio-rad-Methode (6)

Material:

Bio-rad-Proteinassay Dye reagent concentrate (Farbstofflösung) Nr. 500-0006, Fa. Bio-rad Laboratories GmbH, München

Bovines Serumalbumin siehe 2.7.1.

Moni-trol 1 siehe 2.7.1.

Eppendorf-Photometer mit Hg 578 nm-Filter

Prinzip: Bei Bindung an Protein wandert das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie-Brilliantblau-G-250-Lösung von 465 auf 595 nm. BRADFORD (7) zeigte die Anwendbarkeit dieses Prinzips zur Proteinbestimmung. Die Methode ist wenig störanfällig, verträgt viele Zusätze wie z.B. Saccharose gut, die in einer Probe enthalten sein können und ist bedeutend einfacher als der LOWRY--Test, da man nur ein Reagens verwendet unddie Zeitabhängigkeit der Reaktion sehr viel geringer ist. Aufgrund der Unempfindlichkeit gegenüber Saccharose im Ansatz benutzten wir die Methode zur Suche der proteinhaltigen Fraktionen der Saccharosegradienten und zur Proteinbestimmung bei den Inkubationsversuchen mit J^{125}-TSH.

Ein Teil Farbstofflösung wird mit vier Teilen aqua dest. verdünnt und anschließend gefiltert. Eichkurve und Kontrollseren werden wie bei 2.7.1. vorbereitet. 20 µl Probe werden in eine Einmalküvette pipettiert, dann wird Bio-rad-Farbstofflösung zugegeben. Die Extinktion dieses Gemischs wird bei 578 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Da die Farbstofflösung eine sehr hohe Eigenextinktion hat, muß immer ein Blindwert mitgemessen werden. Das Extinktionsmaximum der Farbreaktion liegt bei 595 nm, wir haben bei 578 nm gemessen, da bei dieser Methode zum Feststellen der proteinhaltigen Fraktionen eines Gradienten die Genauigkeit für uns nicht im Vordergrund stand. So konnten wir, um so wenig Protein wie möglich einzusetzen, die in der Gebrauchsanweisung genannten Mengenangaben auf ein Fünftel reduzieren, d.h. statt 100 µl Probe und 5 ml Farbstofflösung setzten wir 20 µl und 1 ml ein.

Aus den Extinktionswerten der Albuminstandards wird eine Eichkurve erstellt. Die Kontrollen werden überprüft (0,1 g/dl: Abweichung bis zu 0,032 mg/ml; 0,05 g/dl: Abweichung bis zu 0,032 mg/ml) und die Extinktionswerte der Proben einer Proteinkonzentration zugeordnet.

2.7.3. Vergleich zwischen LOWRY- und Bio-rad-Methode

Der Proteingehalt einer groben Membranpräparation in Puffer A wurde zum Vergleich sowohl mit der LOWRY- als auch mit der Bio--rad-Methode gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Bio-rad-Metho de einen Wert mißt, der um den Faktor 2,3 niedriger als im LOWRY-Test.

2.8. Bestimmung von protein-gebundenem Jod (PBI) (17)

Wir versuchten, über den ansteigenden Jodgehalt einen Hinweis auf Thyreoglobulin in den letzten Fraktionen, also bei der niedrigsten Dichte, eines kontinuierlichen Saccharosegradienten zu bekommen (s. 3.3.2.). Alle Jodbestimmungen wurden mit dem Auto Analyzer der Firma Technicon ausgeführt.

2.9. Enzymbestimmungen

Das untersuchte Material bestand aus einer groben bovinen Schilddrüsenmembranpräparation und den Auftrennungsprodukten des kontinuierlichen Saccharosegradienten. Um mit unseren Schilddrüsenpräparationen in den Meßbereich der Enzymbestimmungsmethoden zu kommen, mußten die für humanes Serum optimierten Methoden zum Teil abgeändert werden. Als Blindwert wurde 0,9 % NaCl eingesetzt. Es wurden Küvetten von 1 cm Schichtdicke verwendet.

2.9.1. Cholinesterase

Material:

Merckotest Cholinesterase, Art. 3337, Fa. Merck, Darmstadt

Moni-trol 1-Kontrollserum, Fa. Merz und Dade, Abteilung der Amercian Hospital Supply Deutschland GmbH

Eppendorf-Photometer mit Schreiber, Filter Hg 405 nm

Einmalküvetten

Die Cholinesterase ist ein Markerenzym für Plasmamembranen.

Prinzip des Nachweises:

S-Butyrylthiocholinjodid $\xrightarrow{CHE}$ Thiocholin

5,5'-Thiobis-2-Nitrobenzoat + Thiocholin $\longrightarrow$ 5-Mercapto-2-
-Nitrobenzoat (gelb)

2 ml Chromogenlösung, 100 µl Substratlösung und 10 µl Probe (wie im Merckotest angegeben) werden in eine Küvette pipettiert und gut durchmischt. Die ablaufende Kinetik wir bei 405 nm und 25 °C gemessen und mit dem Schreiber aufgezeichnet. Eine Eichkurve von 17 U/l bis 4400 U/l (Moni-trol 1 mit 0,9 % NaCl verdünnt), die grobe Präparation und die 3 Proteinpeaks der Saccharosegradienten werden gemessen.

2.9.2. 5' Nukleotidase

Material:

5' Nukleotidase, Fa. bioMérieux, Charbonnières les Bains, Frankreich

Nr. 6 125 1 Incubation Kit:

1. Substratpuffer: 35 mM Veronal pH 7,7 + 7 mM AMP
2. $MgCl_2$ 0,52 M
3. $NiCl_2$ 0,26 M

Nr. 6 126 1 Coloration Kit:

4. Phosphor 50 mg/l
5. 0,75 M Acetatpuffer pH 4,25
6. 110 mM Ascorbinsäure
7. 40 mM Ammoniummolybdat

Eppendorf-Photometer, Filter Hg 691 nm

5' Nukleotidase, Nr. 39028, Fa. BDH/Paesel, Frankfurt/Main

5' Nukleotidase ist ein sehr spezifisches Markerenzym für Plasmamembranen. Sie katalysiert die Reaktion:

5' AMP $\xrightarrow[\text{Alk.Phosphatase}]{\text{5' Nukleotidase}}$ Adenosin + H_3PO_4

Das Enzym wird, im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase, durch Nickelionen selektiv gehemmt. So werden pro Probe zwei Werte gemessen, die Aktivität von alkalischer Phosphatase und

5' Nukleotidase (ohne Nickelionen) und die Aktivität der alkalischen Phosphatase ohne 5' Nukleotidase (bei Zugabe von $NiCl_2$). Das freigewordene Phosphat bildet mit dem Ammoniummolybdat in Gegenwart der Ascorbinsäure einen Komplex und kann photometrisch bei 691 nm bestimmt werden. Die Präparationen werden an einer Eichkurve von 39 U/l bis 20 000 U/l gemessen.

Um die Aktivität der 5' Nukleotidase zu bestimmen, muß die Differenz zwischen den Extinktionen der beiden Enzyme und der alkalischen Phosphatase alleine berechnet und von der Eichkurve abgelesen werden. Die Methode ist zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase nicht geeignet, da diese weder im Extinktionsoptimum noch mit spezifischem Substrat gemessen wird.

Im Ansatz wird jeweils nur die Hälfte der in der Kit-Beschreibung angegebenen Volumina eingesetzt.

500 µl Reagens 1 und 50 µl $MgCl_2$ 0,52 M werden in jedes, 50 µl $NiCl_2$ 0,26 M nur in jedes zweite Röhrchen gegeben. Das Gemisch wird drei Minuten bei 37 °C inkubiert, dann wird überall 50 µl Probe zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen mit 750 µl 0,75 M Acetatpuffer pH 4,25 aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Jetzt wird in die Röhrchen, die noch kein Nickel enthalten, in denen also die Aktivität von alkalischer Phosphatase und 5' Nukleotidase gemessen wird, 50 µl 0,26 M $NiCl_2$ gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Dann werden überall 500 µl Ascorbinsäure und 100 µl Ammoniummolybdat zugegeben und nochmals 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben in kaltem Wasser abgekühlt und bei 691 nm im Eppendorf-Photometer gemessen.

2.9.3. Alkalische Phosphatase

Material:

Alkalische Phosphatase opt. Automatenpackung, Nr. 123862, Fa. Boehringer, Mannheim

1,02 M Diäthanolamin-Puffer pH 9,8

0,51 mM $MgCl_2$

10,2 mM Natriumnitrophenylphosphat

alkalische Phosphatase, Nr. 32479, ca. 20 U/mg, lyophilisiert, Fa. Serva, Heidelberg

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 405 nm

Auch die alkalische Phosphatase ist ein Markerenzym für Plasmamembranen. Sie wird mit folgender Reaktion nachgewiesen:

p-Nitrophenylphosphat+ $H_2O \xrightarrow{APH}$ p-Nitrophenol + Phosphat

Zu 20 µl Probe (0,9 % NaCl, Eichkurve von 15,6 U/l bis 2000 U/l) werden 1,5 ml des Substratpuffers gegeben (die Hälfte der in der Kit-Beschreibung angegebenen Volumina). Die bei Zimmertemperatur ablaufende Kinetik wird mit dem Photometer bei 405 nm gemessen und vom Schreiber aufgezeichnet. Aus der Extinktionsänderung pro Minute wird mittels der Eichkurve die Aktivität der Proben bestimmt.

2.9.4. Cytochrom-Oxydase (10)

Material:

Reaktionsgemisch:
30 ml 0,03 M Phosphatpuffer pH 7,4 + 1,7 x 10^{-5} M Cytochrom C, Nr. 103861, Fa. Boehringer, Mannheim
+ 100 µl 1,2 M Natriumhyposulfit, Nr. 71700, Fa. Fluka, Neu-Ulm

Kaliumhexacyanoferrat, Art. 4973, Fa. Merck, Darmstadt

Cytochrom-Oxydase, ca. 0,3 U/mg Protein, rein, Nr. 18066, Fa. Serva, Heidelberg

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 546 nm

Die Cytochrom-Oxydase ist ein Markerenzym für Mitochondrien.

Das Reaktionsgemisch wir hergestellt und ca. 10 Minuten bei 37 °C kräftig geschüttelt, um überschüssiges Natriumhyposulfit zu entfernen. Durch einen Testansatz wird festgestellt, wann kein Natriumhyposulfit mehr reduzierend wirkt und die Cytochrom-Oxydase wirken kann.

10 µl Probe und 1 ml Reaktionsgemisch werden zusammenpipettiert und der Ablauf der Reaktion im Photometer bei 546 nm und 25 °C gemessen und mit dem Schreiber aufgezeichnet. Nachdem die Reaktion abgelaufen ist oder ein Plateau erreicht hat, werden ein paar Körner Kaliumhexacyanoferrat zugegeben, um das Cytochrom C vollständig zu oxydieren und die Reaktion so zu stoppen; die Extinktion wird wieder bestimmt. Zur Auswertung zogen wir die Eichkurve (78 bis 2500 U/l) heran.

2.9.5. Citratsynthase (23, 35)

Material:

Triäthanolaminpuffer 0,1 M pH 8,5

Triäthanolamin x HCl, Nr. 127426, Fa. Boehringer, Mannheim

L-Äpfelsäure (19 mg/ml), Natriumsalz, rein, Nr. 11064, Fa. Serva, Heidelberg

APAD (Acetylpyridinadenindinukleotid) 10 mM, Nr. 101966, Fa. Boehringer, Mannheim

Malat-Dehydrogenase, Nr. 127256, Fa. Boehringer, Mannheim

Acetyl-CoA (8,4 mM, entsprechend 7 mg/ml), Nr. 101893, Fa. Boehringer, Mannheim

Citratsynthase, Nr. 103373, Fa. Boehringer, Mannheim

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 366 nm

Wärmebad mit Wärmeblock

Die Citratsynthase sitzt an der inneren Membran der Mitochondrien und wird nach Ruptur der Membran freigesetzt.

Zur Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität muß eine Indikatorreaktion vorangehen:

$$\text{Äpfelsäure} + \text{Acetylpyridinadenindinukleotid} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Oxalacetat} + \text{APAD-H}$$

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} \xrightarrow{\text{Citratsynthase}} \text{Citrat} + \text{CoA-SH}$$

Die Citratsynthetase katalysiert die Reaktion des in der Indikatorreaktion entstandenen Oxalacetats mit Acetyl-CoA. In

gleichem Maße wie Oxalacetat in dieser Reaktion verbraucht wird, wird das reduzierte APAD-H gebildet, dessen Zunahme bei 366 nm gemessen werden kann und einen direkten Schluß auf die Citratsynthase-Aktivität zuläßt. Die Methode wurde für unsere Präparationen optimiert.

750 µl Triäthanolaminpuffer (s. oben), 40 µl Äpfelsäure (19 mg/ml), 40 µl APAD 10 mM, 50 µl Probe und 50 µl MDH (Malatdehydrogenase) werden in eine Küvette pipettiert und fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, damit sich das Gleichgewicht Äpfelsäure/Oxalacetat einstellt. Dann wird die Reaktion mit 40 µl Acetyl-CoA gestartet. Die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit ist ein Maß für die Citratsynthase-Aktivität und wird anhand einer Eichkurve (78 bis 1250 U/l) umgerechnet.

2.9.6. Isocitratdehydrogenase (ICDH)

Material:

ICDH Test-Kombination, Nr. 125989, Fa. Boehringer, Mannheim
- Reagens 1: Triäthanolaminpuffer 0,1 M pH 7,5
  DL-Isocitrat 4,6 mM
  NaCl 52 mM
- Reagens 2: NADP 9,1 mM
  $MnSO_4$ 124 mM

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 366 nm

Die Isocitratdehydrogenase ist ein Markerenzym der Mitochondrien. Die dem Test zugrunde liegende Reaktion ist

$$\text{Isocitrat} + NADP^+ \xrightarrow{ICDH} \alpha\text{-Oxoglutarat} + CO_2 + NADPH + H^+$$

100 µl Probe und 500 µl Reagens 1 werden gemischt und fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann werden 20 µl Reagens 2 zugegeben und die Extinktionsänderung bei 366 nm mit dem Photometer und dem Schreiber registriert. Die Aktivität wird nach der Formel: Aktivität (U/l) = 1771 x Δ E/min bei 366 nm berechnet.

2.9.7. Laktatdehydrogenase

Material:

Monotest, LDH opt., Nr. 158186, Fa. Boehringer, Mannheim
0,18 mM NADH
50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
0,6 mM Pyruvat

LDH, Nr. 127230, Fa. Boehringer, Mannheim

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 366 nm

Die Laktatdehydrogenase ist im Cytosol zu finden und katalysiert folgende Reaktion:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + NAD^+$$

33 µl Probe und 1 ml Reagentienlösung Monotest LDH werden bei Zimmertemperatur in eine Küvette gegeben und gut durchmischt. Dann wird die Extinktionsabnahme bei 266 nm im Eppendorf-Photometer gemessen und mit dem Schreiber aufgezeichnet. Die Aktivität wird mittels einer von 86 bis 5500 U/l reichenden Eichkurve bestimmt.

2.9.8. ß-Glucuronidase (4)

Material:

1. 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,5
   11,4 g K_2HPO_4 x 3 H_2O + aqua bidest. ad 100 ml
   6,9 g NaH_2PO_4 x H_2O + aqua bidest. ad 100 ml,
   auf pH 6,5 einstellen
2. Puffer-Gebrauchslösung:
   0,02 M Phosphatpuffer pH 6,5
   0,1 M Mercaptoäthanol (2-Mercaptoäthanol, Nr. 28625, Fa. Serva, Heidelberg)
   8 ml Lösung [1.] + 1,4 ml Mercaptoäthanol + aqua bidest. ad 200 ml, vor Gebrauch frisch zubereiten.
3. 25 mM p-Nitrophenyl-ß-D-Glucuronid (7,9 mg/ml), Nr. 107883, Fa. Boehringer, Mannheim

4. Natriumkarbonat-Lösung 1 M, Art. 6392 E, p.a., Fa. Merck, Darmstadt
   10,6 g Na_2CO_3 + aqua bidest. ad 100 ml
5. ß-Glucuronidase, Nr. 127051, Fa. Boehringer, Mannheim

Wärmebad und Wärmeblock

Eppendorf-Zentrifuge Nr. 5413

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 405 nm

ß-Glucuronidase ist ein lysosomales Enzym und wird mit folgender Reaktion nachgewiesen:

p-Nitrophenylglucuronid + H_2O $\xrightarrow{\text{ß-Glucuronidase}}$ p-Nitrophenol + Glucuronat

Die Methode wurde für unsere Gegebenheiten modifiziert.

50 µl Probe, 1 ml der Puffer-Gebrauchslösung und 50 µl Substrat oder Wasser werden zusammengegeben und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proben, die die Schilddrüsenpräparationen enthalten, werden noch 10 Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die Enzymaktivität der Eichkurve (ß-Glucuronidase in der Puffer-Gebrauchslösung verdünnt: 0,78 bis 100 U/l) wird schon vorher, die der Präparationen erst nach dem Zentrifugieren durch Zugabe von 400 µl 1 M Na_2CO_3 zu 800 µl des Ansatzes gestoppt. Nach einer Minute wird die Extinktion jeder Probe bei 405 nm gemessen. Die Aktivität der Präparationen wird mit Hilfe der Eichkurve bestimmt.

2.9.9. Glucose-6-Phosphatase (3)

Material:

0,1 M ß-D-Glucose-6-Phosphat (Na-Salz), Nr. 105333, Fa. Boehringer, Mannheim

35 mM Histidin, Art. 4351, Fa. Merck, Darmstadt

Na-EDTA (Titriplex III), p.a., Nr. 8418, Fa. Merck, Darmstadt

20 %-ige Trichloressigsäure, Art. 9415, p.a., Fa. Merck, Darmstadt

Mercko-Test für anorganisches Phosphat, Art. 3331, Fa. Merck, Darmstadt

Glucose-6-Phosphatase, Nr. G 5758, Fa. Sigma

Wärmeschüttelbad Köttermann

Eppendorf-Zentrifuge, Nr. 5413

Eppendorf-Photometer, Schreiber, Filter Hg 578 nm

Die Glucose-6-Phosphatase sitzt bevorzugt am endoplasmatischen Retikulum. Sie katalysiert folgende Reaktionen:

$$\text{Glucose-6-Phosphat} + H_2O \longrightarrow \text{Glucose} + PO_4$$

Der Ansatz enthält ein Zehntel der bei (3) angegebenen Volumina.

Fünf Teile 35 mM Histidin, ein Teil EDTA, ein Teil H_2O und zwei Teile Glucose-6-Phosphat 0,1 M werden gemischt und auf pH 6,5 gebracht. 50 µl dieses Reaktionsgemisches werden mit 50 µl Probe 30 Minuten lang bei 37 °C geschüttelt. Danach wird die Reaktion mit 50 µl 20 %-iger Trichloressigsäure gestoppt und der Ansatz 10 Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Das freigewordene Phosphat wird im Überstand mit dem "Mercko-Test Anorganisches Phosphat" bestimmt. Die Aktivität der Präparationen wird an der Eichkurve (0,031 bis 2 U/l) gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen mit der groben Membranpräparation

3.1.1. Einfluß der Zentrifugationskraft auf die Membranpräparation

Der Ultrazentrifugationsschritt der groben Präparation wurde mit 10 000, 20 000 und 30 000 g durchgeführt. Der Proteingehalt der resultierenden Präparationen wurde mit der LOWRY-Methode gemessen. Das TSH-Bindungsverhalten wurde mit dem RRA (B/F-Trennung durch reine Zentrifugation) untersucht (s. Tab. 1).

Tab. 1: Proteingehalt und spezifische TSH-Bindung einer groben Membranpräparation bei verschiedenen Präparations-g-Zahlen

Präp.-g-Zahl	[Protein] (mg/ml)	spezif. TSH-Bindung (B/F-Trennung durch reine Zentrifugation) bei 100 µg Prot./Ansatz
10 000 g	10,2	10,2
20 000 g	9,2	11,8
30 000 g	9,3	12,1

In Proteingehalt und Bindungsverhalten zeigten sich nur unwesentliche Unterschiede. Wir entschieden uns, soweit nicht anders angegeben, für 20 000 g zur Routinepräparation.

3.1.2. Vergleich zwischen hypo- und isotoner Präparation

In der Literatur werden Präparationen im hypo-(13, 55) und isotonen Medium (16, 37, 54) diskutiert. Wir verglichen hypotone Präparationen mit 10 mM Tris HCl pH 7,4 als Homogenisierungspuffer und isotone, bei denen 0,32 M Saccharose zu dem genannten Puffer zugegeben worden war (s. 2.1.2.). Es zeigte sich, daß die Proteinausbeute bei der hypotonen Präparation um ca. 20 % höher war (s. Tab. 2).

Tab. 2: Proteinausbeute bei Präparation im hypo- und isotonen Medium

	I	II
hypotone Präparation (mg Protein/ml)	10,5	12,5
isotone Präparation (mg Protein/ml)	8,6	10,2

I und II: Zwei verschiedene Präparationen aus zwei bzw. fünf humanen Schilddrüsen; das Schilddrüsenmaterial wurde auf das iso- bzw. hypotone Medium verteilt. Proteinbestimmung nach LOWRY.

Im RRA (B/F-Trennung durch reine Zentrifugation) wiesen 100 µg der hypotonen Präparation eine um 3,5 % höhere spezifische TSH-Bindung als die isotone Präparation auf.

Wegen der höheren Proteinausbeute und der höheren spezifischen TSH-Bindung entschlossen wir uns, unsere Präparation im hypotonen Medium durchzuführen.

3.1.3. Eichkurven der groben Präparation

Eichkurven der TSH-Bindung in isotoner Kochsalzlösung ergaben für die isotone Präparation menschlicher Schilddrüsen eine untere Nachweisgrenze (definiert als dreifache Standardabweichung des Nullwerts) von 4,142 mE/ml und für die hypotone Präparation menschlicher Schilddrüsen eine untere Nachweisgrenze von 4,155 mE/ml bei jeweils 75 µg Protein pro Röhrchen. Bovine Schilddrüsen, in hypotonem Medium präpariert, erbrachten in einer Eichkurve in Puffer C eine untere Nachweisgrenze von 0,014 mE/ml und ein 50-%-Intercept von 0,473 mE/ml bei einem Proteingehalt von 50 µg pro Röhrchen (s. 3.3.6., Abb. 15). Der Standardleerwert (Nullwert B_0) lag bei 5555/5652 cpm.

3.2. Ergebnisse der Auftrennung mit dem Zweiphasensystem

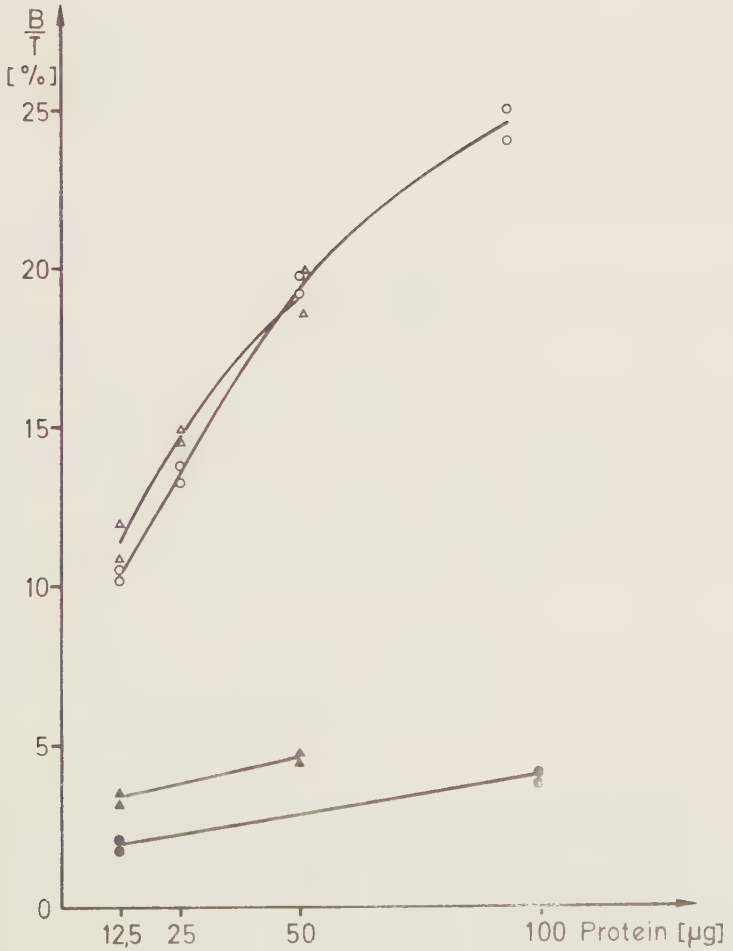
Versuche mit 10 000- und 30 000 g-Präparationen ergaben, daß die Resultate der Auftrennung über das Zweiphasensystem nur in sehr geringem Maße mit der g-Zahl zusammenhängen, bei der die grobe Präparation erfolgte. Deshalb blieben wir bei der 20 000-g--Standardpräparation als Ausgangsmaterial. Das Material der Interphase und des Pellets zeigte fast identische Bindungseigenschaften (s. Abb. 5).

Abbildung 5: Vergleich der Bindungskurven von Material der Interphase und des Pellets nach Auftrennung durch das Zweiphasensystem.

Ausgangsmaterial: grobe bovine Membranpräparation (30 000 g)

RRA: B/F-Trennung durch PEG-Fällung

- ○ Interphase-Gesamtbindung;
- ● Interphase-unspezifische Bindung;
- △ Pellet-Gesamtbindung;
- ▲ Pellet-unspezifische Bindung


B/T [%]
25
20
15
10
5
0
12,5
25
50
100
Protein [µg]

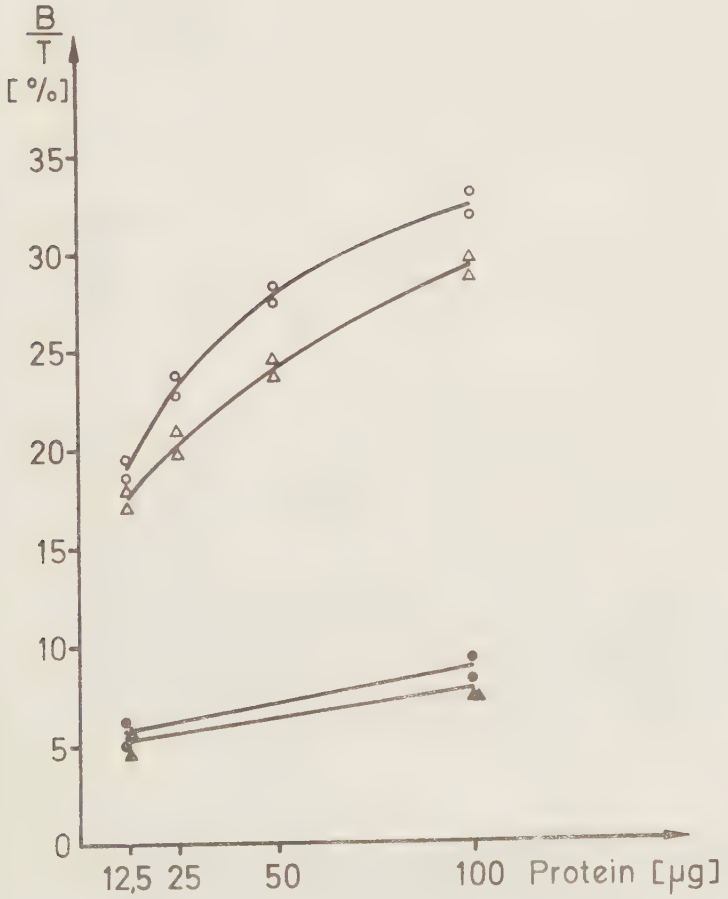
3.2.1. Wiederfindung des Proteins

Vom eingesetzten Gesamtprotein der groben Membranpräparation fanden sich nach der Auftrennung in der Interphase 23,5 bis 46,2 %. Das Pellet enthielt 10,8 bis 19,6 % des eingesetzten Gesamtproteins. Nach starkem Verdünnen und Abzentrifugieren der beiden Phasen des ersten Schrittes der Auftrennung fanden sich ferner 13,7 % in der unteren und 18,6 % in der oberen Phase, Die Gesamtwiederfindung beträgt somit 75,4 bis 89,3 %; die Verluste sind wohl im zweiten Schritt der Auftrennung und in den Waschzentrifugationen zu suchen.

3.2.2. Vergleich zwischen grober Membranpräparation und Zweiphasensystem-gereinigtem Material

Abbildung 6 zeigt die Bindungskurve für eine grobe bovine Membranpräparation und für das gereinigte Material der Interphase. Der RRA (B/F-Trennung durch PEG-Fällung) ergab eine um 2 bis 4 % höhere TSH-Bindung des Interphasematerials, die allerdings mit einer Erhöhung der unspezifischen Bindung um ca. 1 % einhergeht, sodaß die tatsächliche Verbesserung der spezifischen Bindung etwa 1 bis 3 % (bezogen auf die Gesamtaktivität) beträgt.

Abbildung 6: Vergleich der Bindungskurven von Material der groben Membranpräparation und der Interphase nach Auftrennung im Zweiphasensystem;
RRA: B/F-Trennung durch PEG-Fällung
- o Interphase-Gesamtbindung;
- ● Interphase-unspezifische Bindung;
- △ grobe Membranpräparation-Gesamtbindung;
- ▲ grobe Membranpräparation-unspezifische Bindung.


B
T
[%]
35
30
25
20
15
10
5
0
12,5
25
50
100
Protein [µg]

3.2.3. Eichkurve für Pellets aus dem Zweiphasensystem

Da die obigen Versuche zeigten, daß das Pellet fast so gut bindet wie die Interphase (s. 3.2.), wurde eine TSH-Verdrängungskurve mit dem Pellet aus dem Zweiphasensystem getestet. Das Ergebnis (für eine bovine Schilddrüsenpräparation, Eichkurve in Puffer C) zeigte eine untere Nachweisgrenze von 0,013 mE/ml und ein 50-%-Intercept von 2,749 mE/ml bei einer Proteinkonzentration von 100 µg pro Röhrchen.

3.3. Ergebnisse der Aufrennung durch isopyknische Zentrifugation

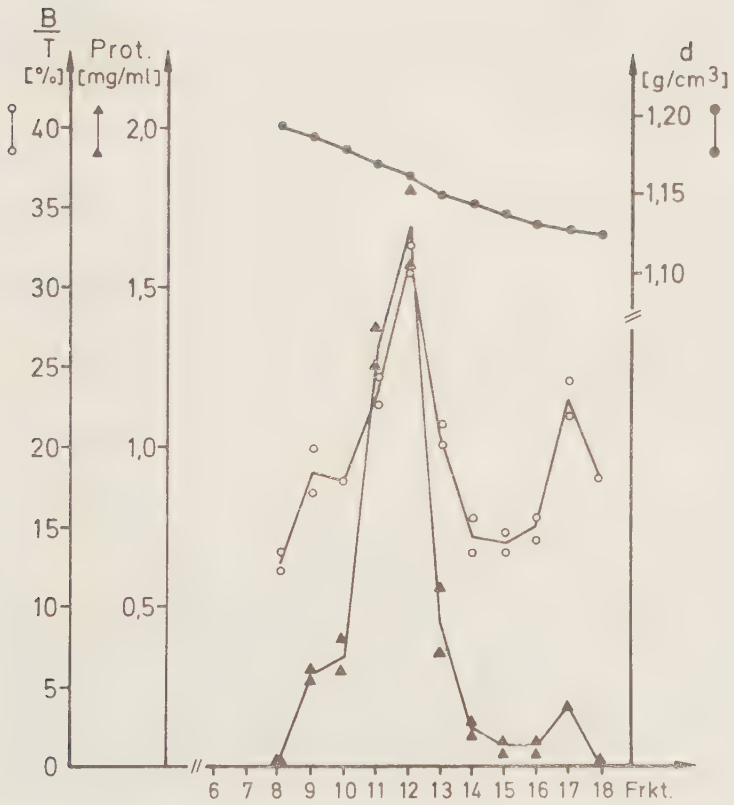
Um zu untersuchen, ob das Medium des Dichtegradienten Einfluß auf die Ergebnisse hat, machten wir Versuche mit Metrizamide und Saccharose.

3.3.1. Ergebnisse des Metrizamide-Gradienten

Der kontinuierliche Metrizamide-Gradient mit Dichten zwischen 1,269 und 1,125 g/cm³ ergab zwei Hauptpeaks in Proteinverteilung und Bindung bei 1,16 g/cm³ (mit einer Schulter bei 1,185 g/cm³) und 1,127 g/cm³ (s. Abb. 7).

Wie im folgenden gezeigt wird, erfolgte die Auftrennung im Saccharosegradienten in gleicher Weise bei nur wenig unterschiedlichen Dichten. Wir entschieden uns für Saccharose als Gradientenmedium.

Abbildung 7: Zusammenhang zwischen TSH-Bindung und Proteingehalt der Fraktionen eines kontinuierlichen Metrizamide-Gradienten (d=1,27-1,125 g/cm³).
Die proteinhaltigen Fraktionen eines kontinuierlichen Metrizamide--Gradienten wurden abzentrifugiert und in gleichen Volumina resuspendiert, d.h. die Proteinmengenverhältnisse der Fraktionen des kontinuierlichen Metrizamide-Gradienten wurden beibehalten.



RRA: B/F-Trennung durch PEG-Fällung. Die unspezifische Bindung betrug bei Fraktion 8 5,5 %, bei Fraktion 10 6,1 %, bei Fraktion 12 8,6 %, bei Fraktion 14 5,7 % und bei Fraktion 16 5,7 %.

▲ Proteingehalt;

O TSH-Gesamtbindung;

● Dichte;

3.3.2. Ergebnisse des kontinuierlichen Saccharosegradienten

Beim kontinuierlichen Saccharosegradienten, der einen Dichtebereich von 1,23 bis 1,14 bzw. 1,22 bis 1,1o g/cm³ abdeckt, zeigten sich drei Proteinpeaks bei d=1,21, 1,18, 1,14 bis 1,12 g/cm³ (s. Abb. 8).

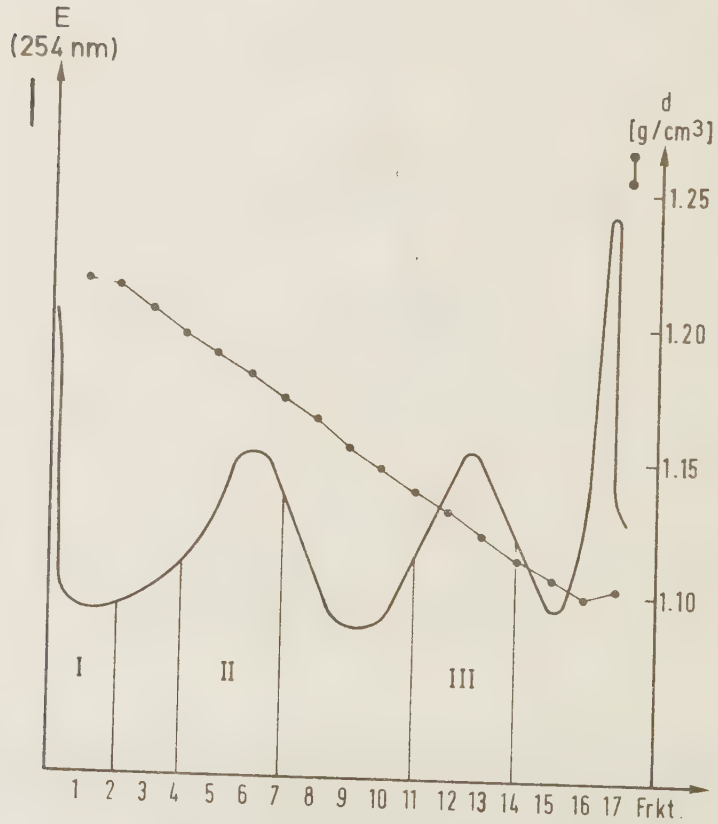


Abbildung 8: Elutionsprofil eines kontinuierlichen Saccharosegradienten.

50-20 % w/w Saccharose, Dichtebereich 1,22-1,10 g/cm³; eingesetztes Material: grobe bovine Membranpräparation, aufgetrennt

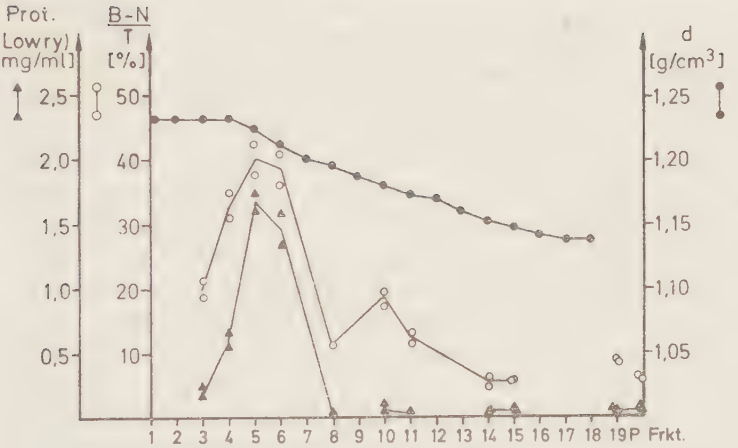


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen TSH-Bindung und Proteingehalt der Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten.

Die proteinhaltigen Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-30 % w/w, d=1,23-1,14 g/cm³) wurden abzentrifugiert und in gleichen Volumina resuspendiert, d.h. die Proteinmengenverhältnisse der Fraktionen des kontinuierlichen Saccharosegradienten wurden beibehalten.

RRA: B/F-Trennung durch PEG-Fällung.

▲ Proteingehalt;

O spezifische TSH-Bindung;

● Dichte;

zu Abbildung 8:

in 17 Fraktionen zu je ca. 2,2 ml. Die Extinktion E wurde bei 254 nm gemessen.

● Dichtegradient

—— Elutionsprofil

Abbildung 9 zeigt eine graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen TSH-Bindung und Proteingehalt der untersuchten Fraktionen. Die proteinhaltigen Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten waren abzentrifugiert und in gleichen Volumina resuspendiert worden. Im RRA wurde das im Saccharosegradienten aufgetrennte Protein nicht auf eine willkürlich gewählte Konzentration gebracht, sondern unverdünnt eingesetzt, d.h. die Proteinmengenverhältnisse der Fraktionen des Saccharosegradienten wurden beibehalten. Die TSH-Bindung der einzelnen proteinhaltigen Fraktionen wurde bestimmt und es zeigte sich, daß bei d=1,22-1,21 g/cm³ (Peak I) eine spezifische Bindung von 39,4 % einer Proteinkonzentration von 1,55 mg/ml gegenüber stand und bei d=1,18 g/cm³ (Peak II) eine spezifische Bindung von 18 % einer Proteinkonzentration von 0,08 mg/ml entsprach. Bei d=1,14 g/cm³ (Peak III) lag die Proteinkonzentration unter 0,02 mg/ml, dabei wurden noch 5 % spezifische Bindung erreicht.

Die Proteinwiederfindung in Peak I-III lag bei 12,3 % der Ausgangsmenge, die Proteinausbeute betrug in Peak I 0,6 %, in Peak II 11,2 % und in Peak III 0,6 %.

Wie in Abbildung 8 erkennbar trat bei der niedrigsten Dichte des Gradienten ein Protein-Nachpeak auf, der sich aber nicht abzentrifugieren ließ. Wir vermuteten, es könnte sich um lösliches Protein, eventuell Thyreoglobulin (Tg) handeln. Da bovines Thyreoglobulin mit den Nachweismethoden für humanes Tg nicht kreuzreagiert, versuchten wir, über den Gehalt an Protein-gebundenem Jod (PBI) einen Hinweis auf Tg zu bekommen.

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis einer PBI-Bestimmung in den einzelnen Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-30 % w/w). Die höchsten Jodkonzentrationen wurden zwischen d=1,15 und d=1,135 g/cm³ gemessen.

Die Versuche, das Protein oben bzw, unten aufzutragen, zeigten eine geringfügig bessere Auftrennung wenn die Probe oben appliziert wird.

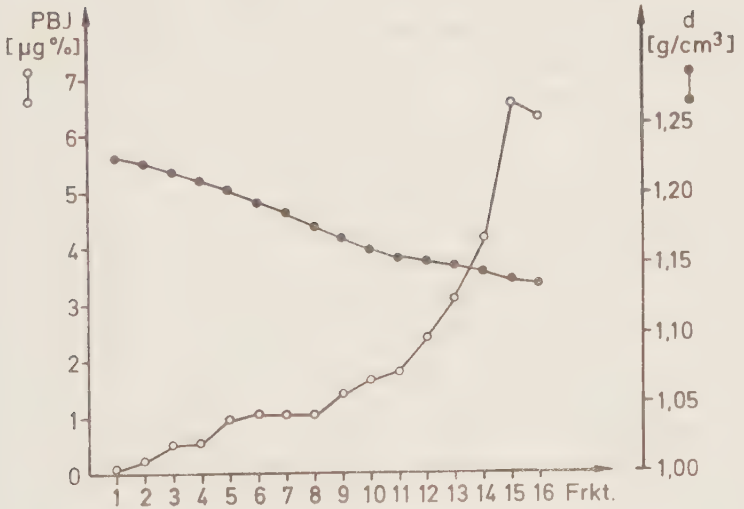


Abbildung 10: Bestimmung von Protein-gebundenem Jod (PBI) in den einzelnen Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-30 % w/w Saccharose)

- o PBI;
- ● Dichte;

Bei Verwendung von humanem Schilddrüsengewebe und frischen bovinen Schilddrüsen wurde die grobe Membranpräparation nicht wie bei zuvor tiefgefrorenen Kälberschilddrüsen in drei scharfe Peaks aufgetrennt, sondern das Protein wurde über den ganzen Dichtebereich verstrichen. Trotzdem wurden die Fraktionen mit einer Dichte von 1,21-1,18 g/cm³ als Peak I, die mit einer Dichte von 1,15-1,14 g/cm³ als Peak II und die mit einer Dichte von 1,12-1,11 g/cm³ als Peak III getrennt untersucht.

Radiorezeptorassays (B/F-Trennung durch Zentrifugation) mit Gradienten-gereinigtem,hypo- oder isotonpräpariertem Material ergaben, daß die hypotone Ausgangspräparation vor allem in Peak I zwischen 3 und 9 % bessere TSH-Bindung aufwies als die isotone (s. Abb. 11).

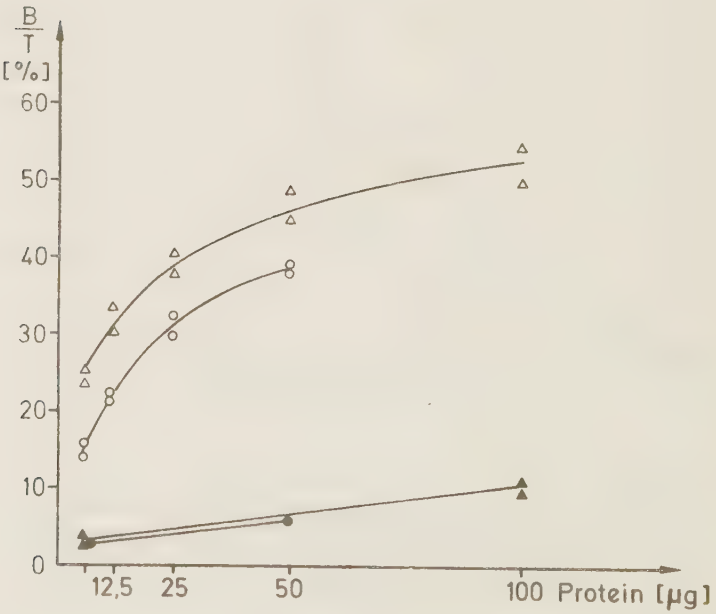


Abbildung 11: Vergleich der TSH-Bindungseigenschaften von Peak I einer hypo- und isotonen groben Membranpräparation.
Material einer hypo- und einer isotonen Grobpräparation humaner Schilddrüsenzellmembranen wurde über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-20 % w/w) aufgetrennt.

△ hypotone Präparation-Gesamtbindung;
▲ hypotone Präparation-unspezifische Bindung;
○ isotone Präparation-Gesamtbindung;
● isotone Präparation-unspezifische Bindung;

3.3.3. Ergebnisse der Inkubationsversuche mit J^{125}-TSH

Nach Inkubation von Material einer groben bovinen Schilddrüsenmembranpräparation mit Membran-gereinigtem J^{125}-TSH und anschließender Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten zeigte das Elutionsprofil folgendes Bild (s. 12a): Peak I fehlt, Peak II (d=1,185-1,165 g/cm³) und Peak III (d=1,12--1,10 g/cm³) erreichten gleiche Proteinextinktionen.

Die Bestimmung der Radioaktivität in jeder Fraktion zeigte einen Gipfel bei Fraktion 5, 6, 7, entsprechend Proteinpeak II mit 1517/2205/2097 cpm und Fraktion 13, 14, 15, 16, entsprechend Proteinpeak III mit 3864/12463/14498/5907 cpm.

Zur Kontrolle wurde je ein Gradient mit reinem J^{125}-TSH und reinem NaJ^{125} beschickt. Beide erreichten ihr Aktivitätsmaximum in Fraktion 13-17 entsprechend d=1,12-1,10 g/cm³ (s. Abb. 12b). Der Befund bedeutet, daß sowohl ungebundenes J^{125}-TSH als auch NaJ^{125} bei der gleichen Dichte erscheinen wie Peak III der aufgetrennten Präparation.

Nachdem das Protein der groben Membranpräparation aus dem Gradientenmedium abzentrifugiert worden war, wurde Proteingehalt und Radioaktivität des Pellets bestimmt (s. Abb. 12c). Aus Peak II konnte Protein in einer Konzentration von 0,854 mg/ml, aus Peak III in einer Konzentration von 0,073 mg/ml abzentrifugiert werden. Obwohl Peak II und III des Elutionsprofils (s. Abb. 12a) vor dem Abzentrifugieren annähernd gleiche Proteinmengen enthielten, war der Gehalt an zentrifugierbarem Protein in Peak III um ungefähr 90 % niedriger als in Peak II.

Bei der Aktivitätsbestimmung nach dem Abzentrifugieren fanden sich in Peak II noch 49,1-49,4 % der Aktivität vor dem Abzentrifugieren, in Peak III dagegen nur noch 1,3-1,5 % der Aktivität vor dem Abzentrifugieren.

Die Aktivitätsgipfel von J^{125}-TSH und NaJ^{125} ließen sich bei 22 000 g nicht abzentrifugieren. Wegen der Überlagerung von Peak III mit dem J^{125}-TSH- und Jodidpeak kann die nicht abzentrifugierbare Aktivität aus nichtgebundenem J^{125}-TSH, radioaktivem Jodid oder an lösliche Rezeptoren gebundenem J^{125}-TSH bestehen.

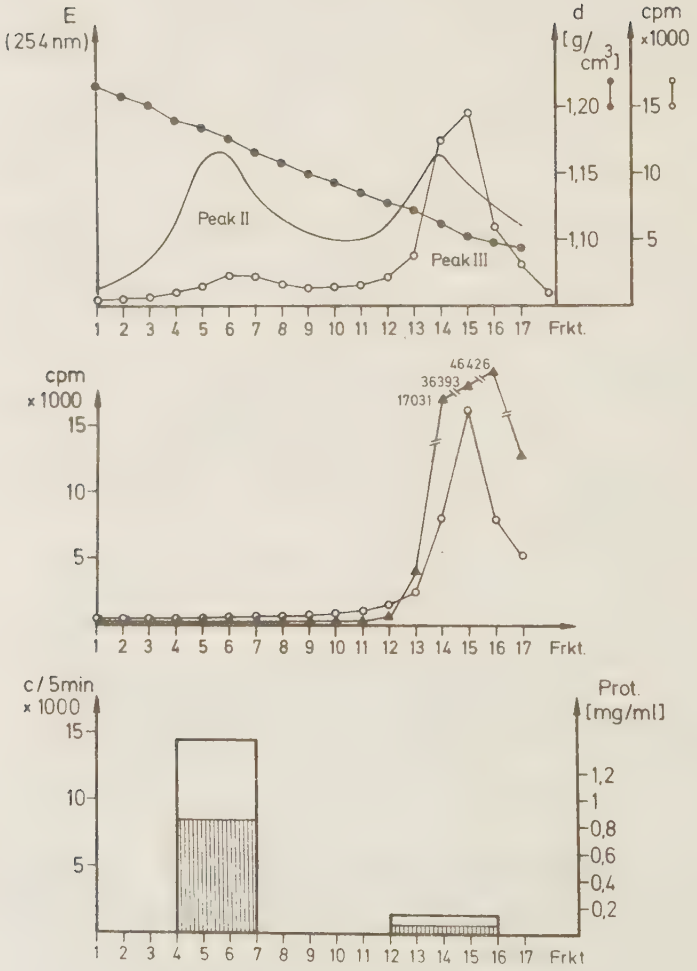

E
(254 nm)
d
[g/cm³]
cpm
×1000
1,20
1,15
1,10
15
10
5
Peak II
Peak III
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 Frkt.
cpm
× 1000
15
10
5
46426
36393
17031
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 Frkt.
c / 5min
× 1000
15
10
5
Prot.
[mg/ml]
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 Frkt

Abbildung 12a: Elutionsprofil der Auftrennung über kontinuierlichen Saccharosegradienten nach Inkubation der groben bovinen Membranpräparation mit J^{125}-TSH.

Material einer groben bovinen Membranpräparation war mit J^{125}--TSH inkubiert worden. Die Auftrennung erfolgte über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-20 % w/w , d=1,215-1,09 g/cm³). Die Abbildung zeigt die Protein- und Radioaktivitätsverhältnisse vor dem Abzentrifugieren. Die Extinktion E wurde bei 254 nm gemessen.

o Aktivität (cpm=counts per minute);

——— Elutionsprofil;

● Dichte;

Abbildung 12b: Auftragung der Radioaktivitätszählraten von J^{125}-TSH und NaJ^{125}, aufgetrennt über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (s. Abb. 12a).

o J^{125}-TSH;

▲ NaJ^{125};

Abbildung 12c: Gehalt an Protein und gebundenem J^{125}-TSH in Peak II und III.

Die Fraktionen 5-7 und 13-16 des in Abbildung 12a gezeigten Dichtegradienten wurden abzentrifugiert. Die Abbildung zeigt Protein- und Radioaktivitätsverhältnisse nach dem Abzentrifugieren.

┌──┐ Aktivität nach dem Abzentrifugieren;

┌┐┌┐┌┐ Proteingehalt nach dem Abzentrifugieren;

3.3.4. Ergebnisse der diskontinuierlichen Gradienten

Beim Stufengradienten wurden die Proteinpeaks erwartungsgemäß schärfer dargestellt, da die Proteinanreicherung in den Grenzschichten der verschiedenen Dichten erfolgt. Abbildung 13 zeigt ein Elutionsprofil einer bovinen Schilddrüsenpräparation im Stufengradienten mit 52 %, 44 %, 35 % und 26 %-igen Saccharoselösungen. Peak I ist einer Dichte von ca. 1,23, Peak II ca. 1,19 und Peak III ca. 1,15 g/cm³ zuzuordnen. Dies entspricht in etwa den Dichten, bei denen die Proteinpeaks im kontinuierlichen Saccharosegradienten zu finden waren.

Auch die menschlichen Schilddrüsenpräparationen zeigten beim diskontinuierlichen Gradienten eine deutlichere Auftrennung als beim kontinuierlichen Saccharosegradienten.

Im RRA (B/F-Trennung durch Zentrifugation) erbrachte der gepoolte Peak III aus zwei Auftrennungen der gleichen groben bovinen Membranpräparation über diskontinuierlichen Dichtegradienten zwischen 2 und 5,5 % höhere spezifische Bindung als Peak II (s. Abb. 14). Bei Peak I ist die Zunahme der Bindung bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge geringer. Die Proteinausbeute lag in Peak I bei 0,4-0,9 %, in Peak II bei 18,3-29,2 %, in Peak III bei 6,4-8,7 %. Die Wiederfindung in Peak I-III betrug 25,1-38,7 % der Ausgangsmenge.

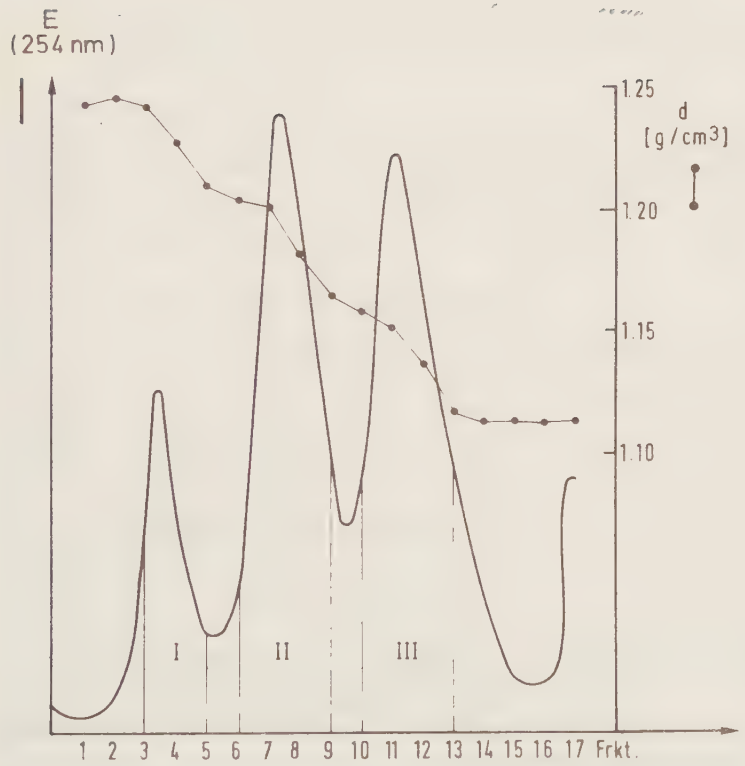


Abbildung 13: Elutionsprofil eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten

Gradient: 52 %, 44 %, 35 %, 26 %-ige (w/w) Saccharoselösung, Dichtebereich von 1,245-1,11 g/cm³; eingesetztes Material: grobe bovine Membranpräparation, Auftrennung in 17 Fraktionen. Die Extinktion E wurde bei 254 nm gemessen.

● Dichte;

——— Elutionsprofil;

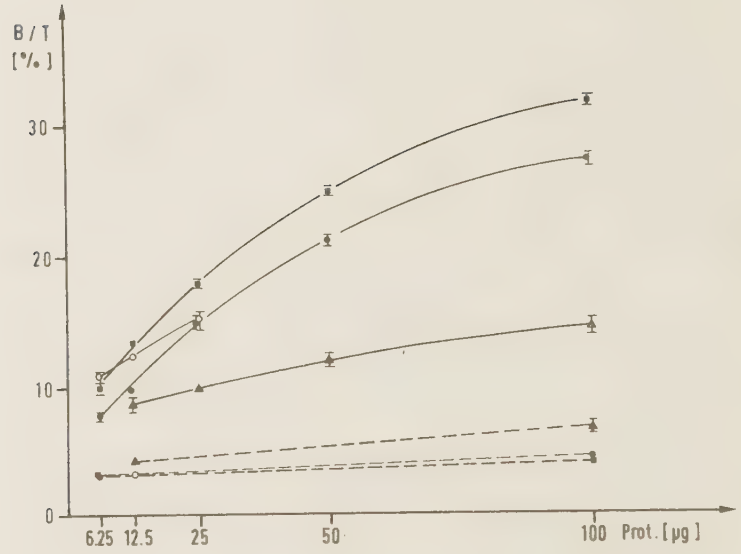


Abbildung 14: Vergleich der Bindungskurven einer groben bovinen Membranpräparation und der Peaks I-III nach Auftrennung im diskontinuierlichen Saccharosegradienten.

RRA: B/F-Trennung durch reine Zentrifugation;

▲ grobe Membranpräparation;

○ Peak I;

● Peak II;

■ Peak III;

——— Gesamtbindung;

– – – unspezifische Bindung;

3.3.5. Ergebnisse der Auftrennung von Zweiphasensystem--gereinigtem Material über einen diskontinuierlichen Gradienten

Die Proteinpeaks dieses Experiments finden sich bei den gleichen Dichten wie bei der Auftrennung von nicht-vorgereinigtem Material (s. 3.3.3.). Im RRA (B/F-Trennung durch Zentrifugation) zeigt Peak III mit steigender Proteinmenge höhere spezifische Bindung, während Peak I deutlich unter diesen Werten liegt.

3.3.6. Ergebnisse der Verdrängungskurven

Um die Ergebnisse der Verdrängungskurven miteinander vergleichen zu können, bestimmten wir vorher mit Bindungsversuchen die Proteinkonzentrationen, bei denen verschiedene Präparationen den gleichen Ausgangswert der Gesamtbindung (Standardleerwert B_0, s. 2.6.4.) erreichen.

Wir untersuchten TSH-Verdrängungskurven, bei denen pro Röhrchen 25 µg Protein aus Peak II und 20 µg aus Peak III einer bovinen Stufengradientenpräparation eingesetzt wurden. Der Standardleerwert B_0 lag bei 6290/7170 bzw. 6619/6210 cpm. Für Peak II lag der 50-%-Intercept bei 0,117 mE/ml, für Peak III bei 0,216 mE/ml (s. Abb. 15).

Der Peak II einer bovinen Präparation , die zuerst über ein Zweiphasensystem und dann über einen Stufengradienten aufgetrennt worden war, erbrachte in einer TSH-Verdrängungskurve bei einer Proteinkonzentration von 35 µg/Röhrchen einen 50-%-Intercept von 0,931 mE/ml. Dieser Wert ist deutlich schlechter als bei der nur Gradienten-gereinigten Präparation; selbst die unbehandelte grobe Präparation (50 µg Protein/Röhrchen, s. 2.1.3.) erbrachte mit einer Verdrängung von 50 % bei 0,473 mE/ml noch eine steilere Eichkurve.

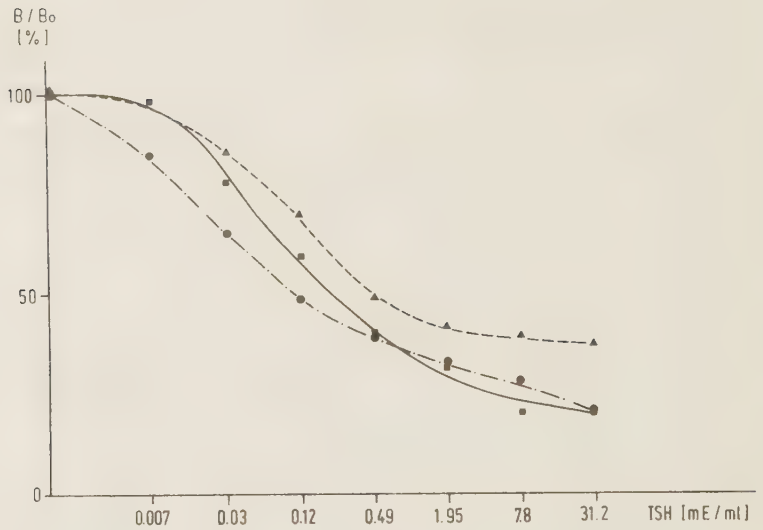


Abbildung 15: TSH-Verdrängungskurven einer groben bovinen Membranpräparation und der Peaks II und III nach Auftrennung im diskontinuierlichen Saccharosegradienten.

Präparationsbedingungen wie bei 3.3.4., TSH-Eichkurve von 0,007-31,2 mE/ml, Ansatz im Puffer C;

▲--▲ grobe Membranpräparation: 50 µg Protein/Röhrchen; B_0: 5555/5652 cpm; 50-%-Intercept 0,473 mE/ml

●-·-● Peak II: 25 µg Protein/Röhrchen; B_0: 6290/7170 cpm; 50-%-Intercept 0,117 mE/ml;

■—■ Peak III: 20 µg Protein/Röhrchen; B_0: 6619/6210 cpm; 50-%-Intercept 0,216 mE/ml;

Die Auftrennung menschlichen Materials bereitete Schwierigkeiten. Da sich im kontinuierlichen Saccharosegradienten keine klar abgrenzbaren Proteinbanden zeigten, untersuchten wir durch Bindungsversuche und Verdrängungskurven, wo sich das Material mit der höchsten spezifischen TSH-Bindung findet. Der Bindungsversuch zeigte, daß Peak I und II die gleiche spezifische Bindung erbrachten, Peak III dagegen deutlich abfiel. In der Verdrängungskurve lag der 50-%-Intercept für Peak I bei 2,491 mE/ml (eingesetzte Proteinkonzentration 2,125 µg/Röhrchen).

In einem Ansatz in isotonischer Kochsalzlösung wurde diese grobe menschliche Präparation mit dem Peak I nach Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten verglichen. Die grobe Präparation (Proteinkonzentration 75 µg/Röhrchen) erreichte 50 % Verdrängung nicht, für Peak I lag der 50-%-Intercept bei 2,887 mE/ml (Proteinkonzentration 50 µg/Röhrchen).

3.3.7. Ergebnisse des SCATCHARD-Plots

Tabelle 3

	Probe	Assoziationskonstante	Max. Bindungskapazität
grobe Präparation	1- 8	$0{,}8133 \times 10^{10}\ M^{-1}$	$0{,}0167 \times 10^{-9}$ M
	9-14	$0{,}0015 \times 10^{10}\ M^{-1}$	$3{,}8229 \times 10^{-9}$ M
Peak II	1-10	$1{,}0580 \times 10^{10}\ M^{-1}$	$0{,}0141 \times 10^{-9}$ M
	11-16	$0{,}0073 \times 10^{10}\ M^{-1}$	$0{,}7521 \times 10^{-9}$ M
Peak III	1-10	$1{,}3400 \times 10^{10}\ M^{-1}$	$0{,}0126 \times 10^{-9}$ M
	11-16	$0{,}0052 \times 10^{10}\ M^{-1}$	$0{,}8617 \times 10^{-9}$ M

Die Verdrängungskurven von Peak II und III nach Reinigung über den Stufengradienten und der zugehörigen groben Präparation (Proteinkonzentration 25, 20 und 50 µg/Röhrchen in Puffer C) wurden der SCATCHARD-Analyse unterzogen (s. Tab. 3). Dabei zeigte sich, daß im steilen Teil der Eichkurve (Probe 1-8 bzw. 1-10) die Assoziationskonstante im Peak III mit $1{,}34 \times 10^{10}\ M^{-1}$ etwas höher lag als bei Peak II ($1{,}06 \times 10^{10}\ M^{-1}$) und der groben

Präparation (0,81 x 10^{10} M^{-1}). Die grobe Membranpräparation wies dagegen den höchsten Wert der maximalen Bindungskapazität (0,0167 x 10^{-9} M) vor Peak II (0,0141 x 10^{-9} M) und Peak III (0,0126 x 10^{-9} M) auf. Im flachen Teil der Eichkurve war die Assoziationskonstante in Peak II etwas höher als in Peak III, die grobe Präparation lag deutlich niedriger. In diesem Bereich lag die maximale Bindungskapazität von Peak II und Peak III jeweils bei etwa einem Fünftel der groben Präparation.

3.4. Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung

3.4.1. pH-Gradient

In den einzelnen Fraktionen, in die der Säuleninhalt durch den Fraktionssammler (Wechselintervall zwei Minuten) nach dem Absaugen aufgetrennt worden war, wurde der pH-Wert gemessen. Wenn wir die Kathode unten und die Anode oben anlegten, entstand bei Verwendung des Ampholyten-Gemisches Servalyt pH 4-9 ein pH-Gradient, der von pH 9,8 bei Fraktion 11 bis pH 3,02 bei Fraktion 70 reicht. Auch wenn die Anode unten und die Kathode oben anlag, entstand ein Gradient zwischen pH 3,02 (bei Fraktion 16) und 9,85 (bei Fraktion 79, s. Abb. 16).

3.4.2. Proteinverteilung

Im Glyceringradienten, bei Anlegen der Anode unten und der Kathode oben, traten Proteinpeaks (Proteinkonzentration nach dem Abzentrifugieren in Klammern) bei 3,26 bis 3,87 (1,32 mg/ml), 3,95 bis 5,10 (5,315 mg/ml), 5,80 bis 7,79 (0,237 mg/ml), 8,79 bis 9,26 (0,091 mg/ml) und 9,85 bis 12,56 (0,089 mg/ml) auf (s. Abb. 16).

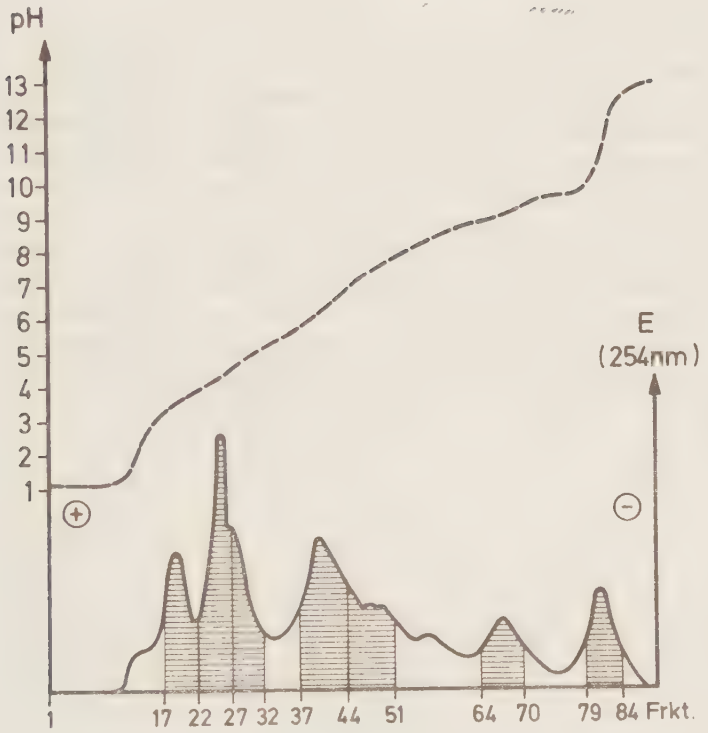


Abbildung 16: Elutionsprofil einer groben bovinen Membranpräparation nach präparativer isoelektrischer Fokussierung

Dichtegradient: 0-60 % Glycerin; pH-Gradient: Servalyt 4-9; Anode unten, Kathode oben angelegt; Extinktion E bei 254 nm gemessen;

– – – pH-Gradient;

——— Elutionsprofil;

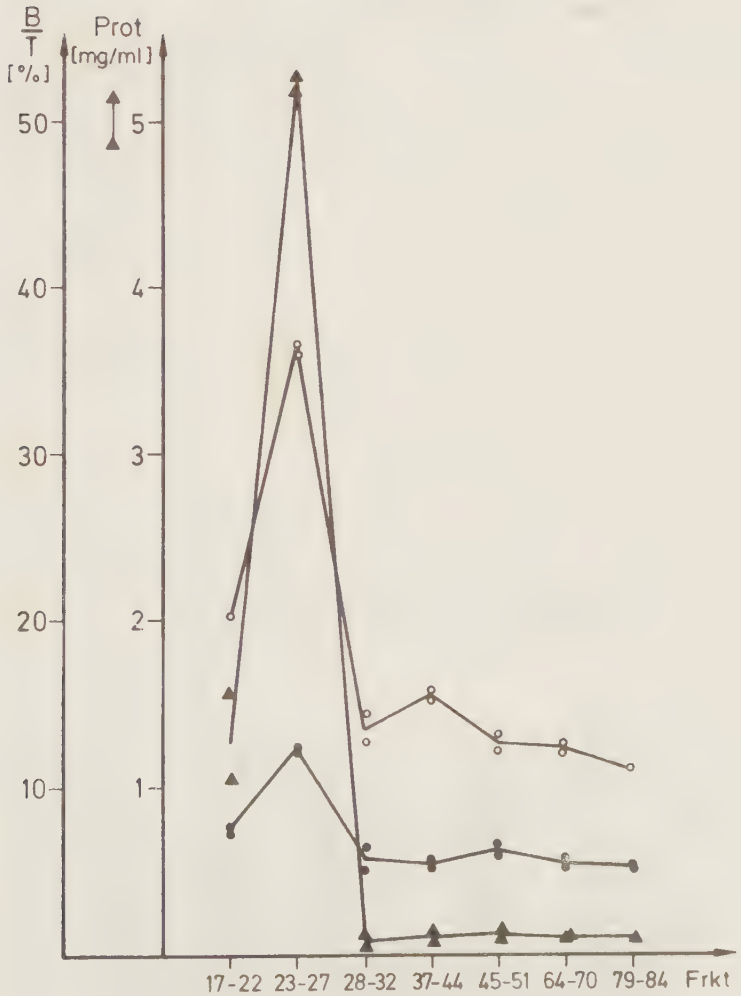
▤ gepoolte Fraktionen.

3.4.3. Bindungskurven

Der Graph, der wie in 3.3.1. beschrieben TSH-Bindung (B/F--Trennung durch PEG-Fällung) und ursprüngliche Proteinmengenverhältnisse der Peaks einer isoelektrischen Fokussierung mit Glyceringradienten und unten angelegter Anode gegeneinander aufträgt, zeigt den Protein- und Bindungsgipfel bei Fraktion 23-27, die pH 3,97 bis 4,50 entsprechen (s. Abb. 17). Bindungskurven mit Proteinverdünnungen (B/F-Trennung durch PEG-Fällung) einer Fokussierung unter gleichen Bedingungen wie oben ergaben, daß der Peak bei pH 3,26 bis 4,13 eine bis um 4,5 % bessere Bindung zeigt als die anderen Proteinpeaks, mit Ausnahme des Proteins bei pH 1,90 bis 3,48, das annähernd gleiche Werte erreicht.

Abbildung 17: Zusammenhang zwischen TSH-Bindung und Proteingehalt der Fraktionen nach präparativer isoelektrischer Fokussierung

Dichtegradient 0-60 % Glycerin, pH-Gradient: Servalyt 4-9; Anode unten, Kathode oben angelegt; RRA: B/F-Trennung durch PEG-Fällung.



▲ Proteingehalt;
○ Gesamtbindung:
● unspezifische Bindung.

3.5. Ergebnisse der Enzymbestimmungen

Die Membranmarkerenzyme (5'Nukleotidase, alkalische Phosphatase, Cholinesterase) werden in Peak III 1,4 bis 4,9-fach angereichert, die anderen Peaks lieferten niedrigere oder gleiche Werte wie die grobe Membranpräparation. Die Mitochondrienmarkerenzyme (Cytochromoxydase, Citratsynthase, ICDH) werden im Peak I 0,6 bis 2,2-fach, im Peak II 2,2 bis 2,8-fach und im Peak III 1,8 bis 3,2-fach angereichert. LDH als cytosolisches Enzym wird in allen drei Peaks in 0,7 bis 2-facher Anreicherung gefunden. ß-Glucuronidase , Markerenzym für Lysosomen wird im Peak II 0,8--fach, im Peak III 13,7-fach angereichert. Für das endoplasmatische Retikulum stand Glucose-6-Phosphatase, deren Konzentration bis zu 3,4-fach (in Peak III) angehoben werden konnte (s. Abb. 18).

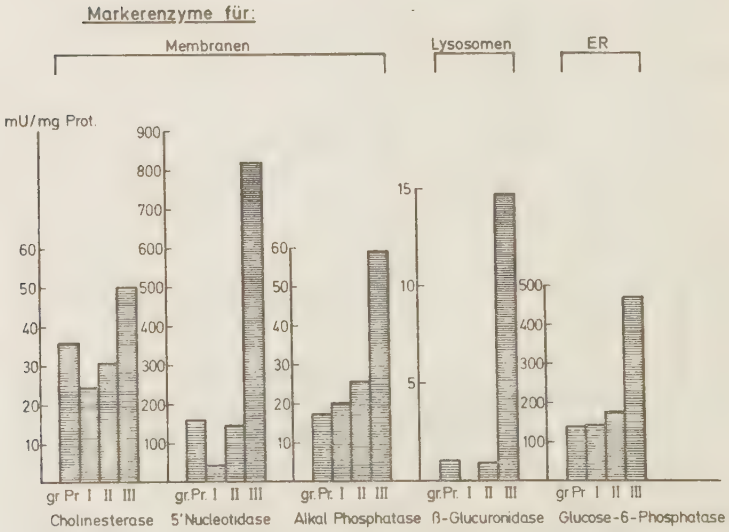
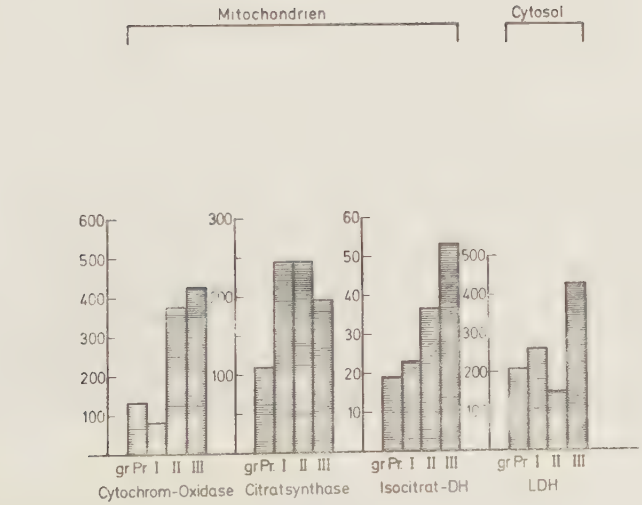


Abbildung 18: Bestimmung der Leitenzyme für Membranen, Mitochondrien, Lysosomen, endoplasmatisches Retikulum und Cytosol in Material der groben bovinen Membranpräparation (gr.Pr.) und der Peaks I-III nach Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-20 % w/w). Angaben der Enzymaktivität in mU/mg Protein.



3.6. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Die grobe Präparation (s. Abb. 19) präsentierte sich als inhomogene Fraktion mit großen Membranfragmenten, endoplasmatischen Retikulum und Proteinaggregaten (möglicherweise Thyreoglobulin). Das Material, das über ein Zweiphasensystem aufgetrennt worden war, enthielt elektronenoptisch vorwiegend Mitochondrien (s. Abb. 20).

Peak I (d=1,21 g/cm³) einer Auftrennung über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten zeigte viele Mikrosomen und Mitochondrien, vereinzelt auch Plasmamembranen (s. Abb. 21). Peak II (d=1,185-1,17 g/cm³) enthält in erster Linie Mitochondrien und Lysosomen (s. Abb. 22). Peak III (d=1,13-1,115 g/cm³) wies Plasmamembranen, Lysosomen, und Mitochondrien auf (s. Abb. 23).

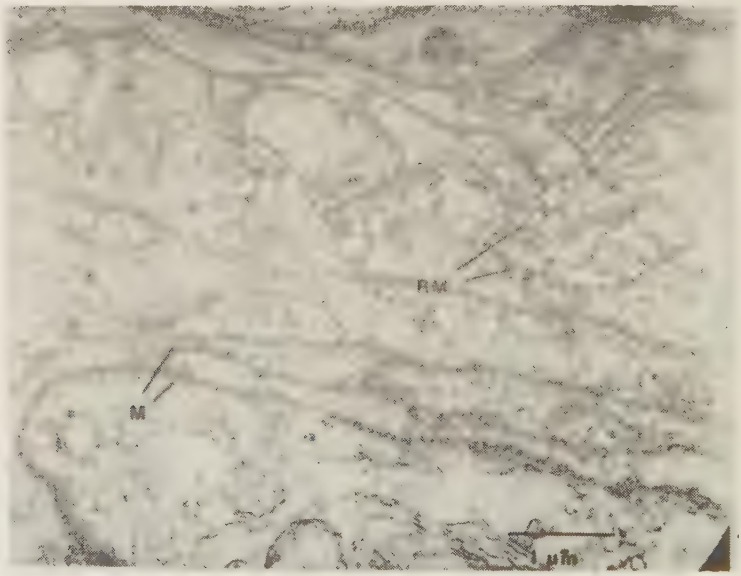


Abbildung 19: Elektronenoptische Darstellung einer groben bovinen Membranpräparation: inhomogene Fraktion mit großen Membranfragmenten, endoplasmatischem Retikulum und Proteinaggregaten. Vergrößerung 12 000-fach.
M: Membranen; RM: Rauhe Mikrosomen, Bruchstücke des rauhen endoplasmatischen Retikulums

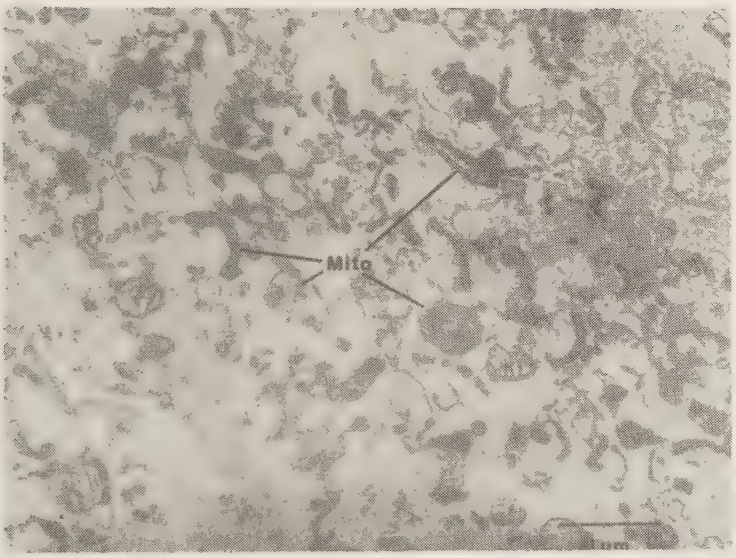


Abbildung 20: Elektronenoptische Darstellung des Interphase-materials nach Auftrennung einer groben bovinen Membranpräparation im Zweiphasesystem: enthält vorwiegend Mitochondrien:, Vergrößerung 30 000-fach.
Mito: Mitochondrien

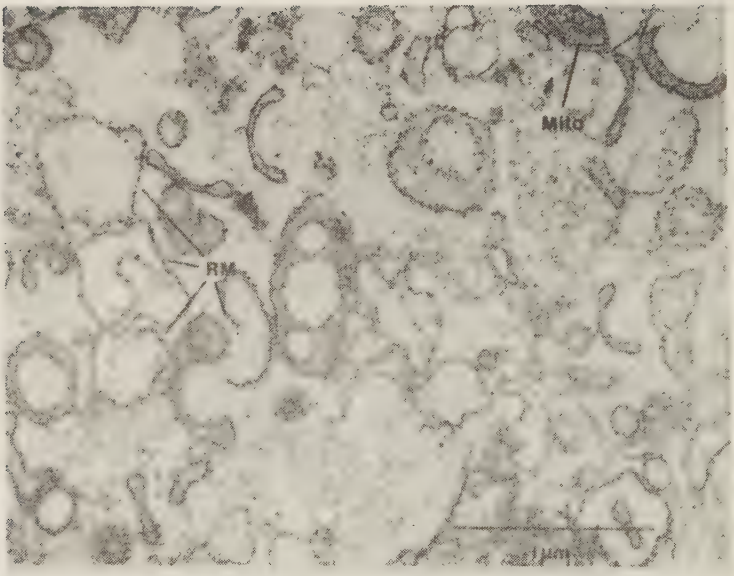


Abbildung 21: Elektronenoptische Darstellung des Materials in Peak I nach Auftrennung einer groben bovinen Membranpräparation über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-20 % w/w):
d=1,21 g/cm³; Mikrosomen, Mitochondrien, vereinzelt Plasmamembranen; Vergrößerung 57 500-fach.
Mito: Mitochondrien; RM:Rauhe Mikrosomen

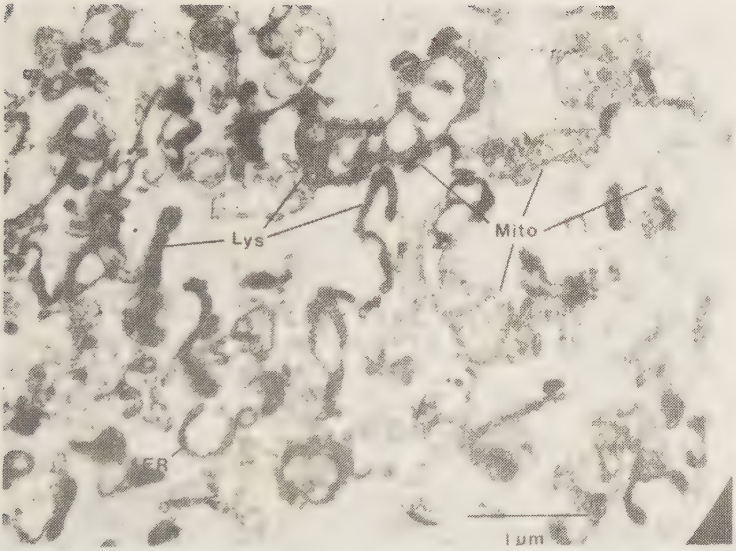


Abbildung 22: Elektronenoptische Darstellung des Materials in Peak II nach Auftrennung einer groben bovinen Membranpräparation über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-20 % w/w):

d=1,185-1,17 g/cm³; Mitochondrien, Lysosomen; Vergrößerung 36 000-fach.

Mito: Mitochondrien; Lys: Lysosomen; ER: endoplasmatisches Retikulum

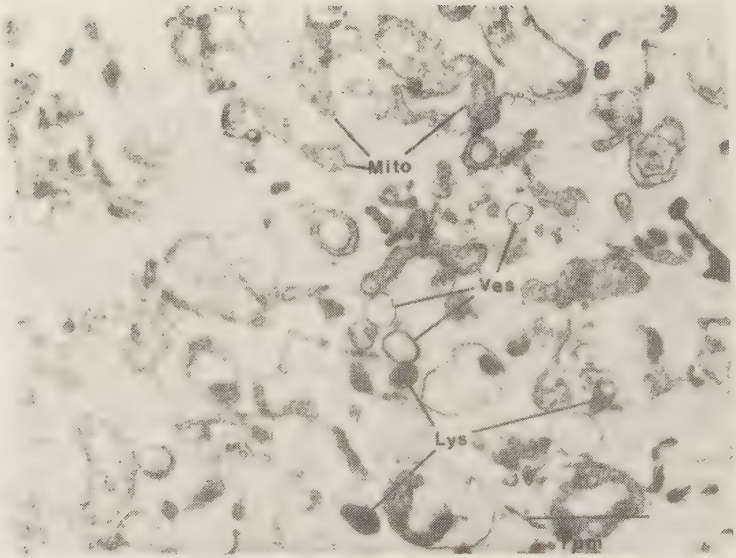


Abbildung 23: Elektronenoptische Darstellung des Materials in Peak III nach Auftrennung einer groben bovinen Membranpräparation über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (50-20 % w/w):
d=1,13-1,115 g/cm³; Plasmamembranen, Lysosomen, Mitochondrien; Vergrößerung 36 000-fach.
Ves: Membranvesikel; Lys: Lysosomen; Mito: Mitochondrien

4. Diskussion

Am Anfang unserer Bemühungen um eine möglichst hohe Reinigung von bovinen Schilddrüsenplasmamembranen stand die Überlegung, die Membranstrukturen mit dem TSH-Rezeptor nicht übermäßig großen mechanischen und chemischen Belastungen auszusetzen, um den physiologischen Gegebenheiten in den in-vitro-Versuchen möglichst nahe zu kommen. Wir wählten die Präparationsmethode nach ZAKARIJA/McKENZIE (56).

Der pH-Wert der Homogenisierungs- und Inkubationsmedien hat laut Literatur (13, 34, 36) Einfluß auf die TSH-Bindungseigenschaften des Schilddrüsenmaterials. Die maximale spezifische TSH-Bindung in vitro wird bei einem pH-Wert von 5,5 bis 6,0 gefunden (34, 36). Nur bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 werden jedoch Bindungsstellen mit zwei unterschiedlichen Assoziationskonstanten (34, 36) beschrieben. Bei pH 7,4 wurde auch eine Steigerung der Sensitivität des RRA beobachtet, ausgedrückt durch die Abnahme des 50-%-Intercepts (36).

Auch die Bedeutung der Osmolarität des Mediums bei der Membranpräparation wurde untersucht. WOLFF und JONES (54) und andere (16, 47, 49) führten ihre Präparationen von Plasmamembranen in isotonen Medien durch. YAMASHITA/FIELD (55) benutzten ein hypotones Medium, dem auch EVANS (13) den Vorzug gibt, da unter diesen Bedingungen Zellen unter dem osmotischen Sog anschwellen und schließlich aufplatzen. Die Membranen liegen dann in größeren Bruchstücken vor und die Anreicherung wird damit einfacher. Unser Vergleich der beiden Grobpräparationsarten zeigte, daß bei Verwendung des hypotonen Mediums die Proteinausbeute insgesamt ca. 20 % höher war und daß das gewonnene Material bei 100 µg Protein/Ansatz eine um 3,5 % höhere spezifische TSH-Bindung aufwies. Wir entschieden uns, unsere Präparationen bei pH 7,4 und im hypotonen Medium durchzuführen.

Bereits tiefgefrorenes bovines Schilddrüsengewebe war besser zu verarbeiten als menschliches oder frisches bovines Material, es zeigte eine geringere Verklumpungstendenz und schärfere Auftrennung im Dichtegradienten. In der schlechteren Qualität des

verwendeten menschlichen Materials liegt wohl die Erklärung für die um den Faktor 10 unempfindlicheren Eichkurven im Vergleich zu den groben humanen Schilddrüsenpräparationen, die die Arbeitsgruppe im routinemäßigen TDA-RRA einsetzt. Die 100-fach höhere Empfindlichkeit der bovinen Präparation resultiert wahrscheinlich nicht nur aus den Eigenschaften des weitgehend unveränderten bovinen Materials und der besseren Effektor--Rezeptor-Kompatibilität im homologen System, sondern auch aus der im Vergleich zu den humanen Verdrängungskurven fehlenden, Bindungs-inhibierenden Wirkung von NaCl.

BRUNETTE/TILL (8) und LESKO et al. (24) beschrieben ein Zweiphasensystem als Möglichkeit der Anreicherung von Plasmamembranen. Die Auftrennung ist von der Ladung des Proteins (19, 51) und der Ionenzusammensetzung des Zweiphasensystems (51) abhängig. Die Ergebnisse der oben erwähnten Arbeiten waren auf Schilddrüsenmembranen nicht übertragbar. Während BRUNETTE/TILL in ihrer Membranfraktion ca. das Siebenfache an Aktivität des Membranmarkerenzyms Natrium-Kalium-aktivierte ATPase bei einer Proteinausbeute von 6,5 % der Ausgangsmenge feststellten, zeigte bei uns das aus der Interphase isolierte Material (Proteinausbeute 23,5-46,2 % der Ausgangsmenge) eine nur geringe Erhöhung der spezifischen TSH-Bindung im Vergleich zur groben Präparation. Auch wiesen das Material der Interphase und des Pellets fast identische Bindungseigenschaften auf (s. 3.2.), sodaß wir keine Hinweise für eine wesentliche Rezeptoranreicherung mit Hilfe des Zweiphasensystems gewinnen konnten. Aus diesem Grunde verzichteten wir auf die Bestimmung der Leitenzyme in den verschiedenen Fraktionen.

Die Methode eignet sich nach unseren Ergebnissen in der vorliegenden Form nicht zur Anreicherung von Schilddrüsenplasmamembranen.

Eine Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Proteinen, auch Zellmembranen, stellt die isoelektrische Fokussierung dar (18). Wir versuchten, neben der pI-Bestimmung auch eine präparative Auftrennung des Zellhomogenats zu erzielen. Der TSH-RRA zeigte, daß der Proteingipfel bei pH 3,62-4,13 eine

um 4,5 % höhere Bindung aufwies als die restlichen Proteinbanden. Somit kann davon ausgegangen werden, daß in den Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 3,62 und 4,13 Zellmembranen angereichert sind. Für Zellmembranen von Thrombozyten und Erythrozyten wurden ähnliche pI-Werte gefunden (18).

Zur isopyknischen Zentrifugation stehen verschiedene Substanzen als Gradientenmedien zur Verfügung; wir untersuchten die Auftrennungseigenschaften von Metrizamide und Saccharose.

Für Metrizamide wurde in einem kontinuierlichen Dichtegradienten das isopyknische Dichteband für Membranen mit unter 1,12 g/cm³ (49) angegeben, für Lysosomen mit 1,15 g/cm³, für unveränderte Mitochondrien mit 1,18 g/cm³ und für veränderte Mitochondrien mit 1,14 bis 1,16 g/cm³ (50).

Wir fanden zwei Proteingipfel bei 1,13 g/cm³ und bei 1,16 g/cm³ mit einer Schulter bei 1,185 g/cm³. Das Eluat bei d=1,13 g/cm³ zeigte im Bindungsversuch die höhere spezifische TSH-Bindung bezogen auf die Menge eingesetzten Proteins, sodaß wir bei dieser Dichte die angereicherten Plasmamembranen vermuten. In Metrizamide-Lösungen liegen Partikel in höherhydriertem Zustand vor als in Gradientenmedien, die die gleiche Dichte erst bei höherer Konzentration erreichen (40, 50). Dadurch wandern die nicht so stark dehydrierten, also weniger dichten Partikel bei der isopyknischen Zentrifugation in Metrizamide zu geringeren Dichten als im Saccharosegradienten (50). Abgesehen von diesen geringen Dichteunterschieden lieferte die Auftrennung im Saccharosegradienten nahezu identische Ergebnisse, sodaß wir uns der leichteren Beschaffung und des bedeutend geringeren Preises wegen für Saccharose als Gradientenmedium entschieden.

Im kontinuierlichen Saccharosegradienten fanden sich Proteinpeaks bei d=1,21 g/cm³ (Peak I), d=1,18 g/cm³ (Peak II) und d=1,14 bis 1,12 g/cm³ (Peak III). Im RRA zeigte sich, daß das Material in Peak III die höchste spezifische TSH-Bindung pro Gewichtseinheit aufwies, worin Hinweise auf eine Anreicherung von Membranstrukturen zu sehen sind.

Unsere Bindungsversuche zeigten bindende Kapazität jedoch nicht

nur im Peak III, sondern auch in Peak II und geringem Maße auch in Peak I.

HILDERSON et al. (16) identifizieren anhand des Membranmarkers 5'Nukleotidase bovine Plasmamembranen bei d=1,13 g/cm³ in Saccharose. EVANS (14) beschreibt "leichte" und "schwere" Fraktionen der Plasmamembranen bei 1,12 bis 1,14 bzw. 1,16 bis 1,18 g/cm³ im Saccharosegradienten. Er fügt aber hinzu, daß man wohl nicht von einer einheitlichen Membrandichte sprechen kann, da diese Eigenschaft z.B. in starkem Maße von der Besetzung der Bruchstücke mit interzellulären Verbindungsstücken (" gap junctions", "tight junctions") abhängt und außerdem ein Teil der Membranen, die bei diesen Dichtewerten zu finden sind, von den Organellen der Zelle wie z. B. dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum stammen. Damit können Membranen sehr heterogen sein, bestimmte Strukturen lassen sich nicht eindeutig einem Dichtebereich zuordnen.

Nach der Auftrennung über kontinuierlichen Saccharosegradienten kann man davon ausgehen, daß sich das TSH-bindende Material vor allem in Peak II und III findet.

Der diskontinuierliche Saccharosegradient stellte die Proteinpeaks erwartungsgemäß schärfer dar als der kontinuierliche, da die Anreicherung des Proteins in den Grenzschichten der verschiedenen Zuckerkonzentrationen erfolgt. Peak I erschien bei d=1,23 g/cm³, Peak II bei d=1,19 g/cm³ und Peak III bei d=1,15 bis 1,13 g/cm³. Die Proteinanreicherung erfolgte bei sehr ähnlichen Dichten wie im kontinuierlichen Gradienten, bei dem Proteingipfel bei d=1,21 1,18 und 1,14 bis 1,12 g/cm³ erschienen. Die geringen Unterschiede lassen sich durch die Vermischung der übereinander liegenden Saccharoseschichten im diskontinuierlichen Gradientensystem erklären.

Da der diskontinuierliche Saccharosegradient Protein nur in vier Dichtestufen auftrennt, im kontinuierlichen Saccharosegradienten dagegen eine Auftrennung über den gesamten Dichtebereich erfolgt, muß dem kontinuierlichen Gradienten zur genauen Charakterisierung des Dichteverhaltens einer Probe der Vorzug gegeben werden.

Dieser Vorteil war jedoch von hohen Ausbeute- bzw. Wiederfindungs-

verlusten begleitet. Die Wiederfindung des Gesamtproteins (d.h. der Bruchteil der eingesetzten Proteinmenge, der sich nach Auftrennung noch nachweisen läßt) lag im diskontinuierlichen Gradienten bei 25 bis 39 %, im kontinuierlichen Gradienten bei 12,3 %. Die Ausbeute im Peak II lag im diskontinuierlichen Gradienten bei 6,4 bis 8,7 %, im kontinuierlichen bei 0,6 %.

Die höchste spezifische TSH-Bindung erbrachte Peak III, d.h. die Proteinbande zwischen 35 %-iger und 26 %-iger Saccharose. Die Bindungswerte lagen um 2 bis 5,5 % über der spezifischen TSH-Bindung von Peak II. Dies weist auf eine Anreicherung der Plasmamembranen in Peak III hin. SUZUKI et al. (47) beschreiben in dieser Schicht Anreicherung von Membranmarkern und geringgradig höhere spezifische TSH-Bindung als in den anderen Banden. Die Ergebnisse von WOLFF und JONES (54), WISHER und EVANS (53) (beim Hepatozyten) und MEHDI/NUSSEY (31) weisen in die selbe Richtung.

Die Auftrennung im diskontinuierlichen Saccharosegradienten zeigte TSH-bindendes Material in Peak II und III. Dem Nachteil der gröberen Auftrennung gegenüber dem kontinuierlichen Saccharosegradienten stand der Vorteil der gesteigerten Proteinausbeute gegenüber.

Die TSH-Verdrängungskurven mit Material aus Peak II bzw. III einer bovinen Stufengradientenpräparation (d=1,18 bzw. 1,14 - 1,12 g/cm³) zeigten mit 0,117 bzw. 0,216 mE/ml nahezu identische Werte für den 50-%-Intercept. Vom Material des Peaks III wurde 20 % weniger Protein eingesetzt, um die gleiche spezifische Bindung wie Peak II zu erreichen. Für die Kurve der groben Membranpräparation mußte das 2,5-fache der Proteinmenge von Peak III eingesetzt werden, um die gleiche spezifische Bindung zu erhalten. Sie verlief mit einem 50-%-Intercept von 0,473 mE/ml flacher als die Kurven von Peak II und III.

Diese Daten geben Hinweise auf eine Anreicherung des gleichen, spezifisch bindenden Materials aus der groben Membranpräparation in Peak II und III; die geringeren Proteinkonzentrationen, die vom Material aus Peak III nötig sind, lassen einen höheren Anreicherungsgrad des an sich gleichen Rezeptormaterials vermuten.

Die Versuchsanordnung im RRA, die nicht von gleichen Gewichtseinheiten Protein, sondern von gleicher TSH-Bindung (B_0) ausgeht, hat zum Ziel, etwa gleiche Rezeptormengen einzusetzen. Unter diesen Bedingungen verlaufen die Verdrängungskurven von Peak II, III und der groben Ausgangspräparation nahezu parallel. Deshalb ist anzunehmen, daß es sich bei der bindenden Struktur in allen drei Fällen um den selben "Rezeptor" handelt, der im Laufe der Präparation kaum verändert wurde. Der Anreicherungseffekt ist also an der eingesetzten Proteinmenge abzulesen. Peak III ist nur wenig höher angereichert als Peak II, da nur 20 % weniger Protein eingesetzt werden muß, um die gleiche TSH-Bindung (B_0) wie in Peak II zu erreichen.

Bei der groben Präparation führt der niedrigere Reinheitsgrad dazu, daß früher als bei Peak II und III unmarkiertes TSH kein J^{125}-TSH mehr aus spezifischen reversiblen Bindungsstellen verdrängen kann, d. h. das Auslaufplateau der Verdrängungskurve liegt bei einem höheren B/B_0-Verhältnis (s. Abb. 16 in 3.3.6.).

Die Angaben über die mittels der SCATCHARD-Analyse errechneten Assoziationskonstanten (K) der TSH-Rezeptoren der Schilddrüsenzellmembranen schwanken in der Literatur. Bei unphysiologischen Inkubationsbedingungen (pH 6,0) wird von nur einer Assoziationskonstanten des TSH-Rezeptors berichtet (48), während bei physiologischen Bedingungen von hoher und niedriger Affinität der Rezeptorstrukturen die Rede ist, ausgedrückt durch zwei verschiedene Assoziationskonstanten. Dieses Phänomen wird mit Auftreten von zwei verschiedenen Rezeptorstrukturen (36) bzw. negativer Kooperativität (48) erklärt. Für die Rezeptorstrukturen mit hoher Affinität werden z. B. Werte der Assoziationskonstanten von 0,25 $x10^{10}$ M^{-1} (48), 1-7$x10^{9}$ M^{-1} (36) oder 1,1$x10^{8}$ M^{-1} (22) angegeben, für die Rezeptorstrukturen niedriger Affinität Werte von 0,25$x10^{8}$ M^{-1} (48), 0,3-1$x10^{7}$ M^{-1} (36) und 1,4$x10^{7}$ M^{-1} (22). Die niedrigeren Assoziationskonstanten (22, 36) für beide Rezeptorstrukturen wurden in Ansätzen ermittelt, die Na-Ionen enthielten, die die Bindung beeinträchtigen (48). Die von uns für bovines Material ohne Na-Ionen ermittelten Assoziationskonstanten lagen mit 1,058 bzw. 1,340 $x10^{10}$ M^{-1} für die hochaffine und 0,0073 bzw.

$0{,}0052 \times 10^{10}\ M^{-1}$ für die niedrigaffine Rezeptorstruktur auch in diesem Rahmen.

Die Assoziationskonstanten der hochaffinen Rezeptorstrukturen von Peak II und III unterschieden sich nur unwesentlich; auch das weist darauf hin, daß in Peak II und III ein und derselbe Rezeptor in unterschiedlicher Anreicherung vorliegt.

Die Stufengradientenauftrennung von Material, das bereits über ein Zweiphasensystem vorgereinigt war, erbrachte schlechtere Ergebnisse, als die Auftrennung des Grobhomogenats. 50 µg Protein des Peaks III(d=1,12-1,14 g/cm³) aus der groben Membranpräparation wiesen eine um 4,5 % höhere spezifische Bindung auf als die entsprechenden Fraktionen des vorgereinigten Materials. Dies zeigt erneut, daß in der Interphase des verwendeten Zweiphasensystems rezeptortragende Membranpartikel nicht angereichert werden.

Die Inkubation von Material der groben Präparation mit J^{125}--TSH mit anschließender Auftrennung im kontinuierlichen Saccharosegradienten zeigte zwei Ergebnisse:

1. Bei der Dichte von 1,185 bis 1,165 g/cm³ (Peak II) lag die Hälfte (49,1-49,4 %) der meßbaren Aktivität des J^{125}-TSH an abzentrifugierbares Protein gebunden vor.
2. Das Maximum an Radioaktivität war in den Fraktionen 13 bis 16, die dem Peak III (d=1,12-1,10 g/cm³) entsprechen, zu finden.

Die Radioaktivität des abzentrifugierten Proteins dieses Peaks III betrug jedoch nur 1,3 bis 1,5 % der Aktivität in den Ausgangsfraktionen 13 bis 16. Diese hohen Verluste werden erklärbar, wenn man berücksichtigt, daß das Aktivitätsmaximum des J^{125}-TSH und des NaJ^{125}, die jeweils ohne zusätzliches Protein der Auftrennung im Saccharosegradienten unterzogen worden waren, in den gleichen Fraktionen erscheint. Die nicht abzentrifugierbare Aktivität könnte in Form von abgespaltenem J^{125}, nichtgebundenem J^{125}-TSH oder eventuell als an lösliche Proteine gebundenes J^{125}-TSH beim Abzentrifugieren verlorengegangen sein.

Die Auftrennung des Schilddrüsenhomogenats durch Dichtegradienten hat ergeben, daß die Partikel mit der höchsten spezifischen TSH-Bindung bei d=1,12 bis 1,14 g/cm³ (Peak III) und d=1,16 bis 1,18 g/cm³ (Peak II) zu finden sind.

Bei d=1,12 g/cm³ (Peak III) lag die Aktivität der 5'Nukleotidase 4,8-fach, der alkalischen Phosphatase 3,4-fach und der Cholinesterase 1,4-fach über der Aktivität im groben Homogenat. In der Literatur werden bei vergleichbarer Dichte Anreicherungen von alkalischer Phosphatase (12, 47) und starke Anreicherungen von 5'Nukleotidase (bis zu 8-fach bei 47) (12, 16, 47) beschrieben. Einige Autoren finden die höchste Aktivität von 5'Nukleotidase (54, 55) und Na-K-aktivierter ATPase (54, 55) jedoch bei d=1,16 bis 1,18 g/cm³. Unsere Experimente zeigten in diesem Dichtebereich jedoch nur eine 0,85 bis 1,5-fache Anreicherung der Membran markerenzyme. Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit der Verteilung der Bindungsmaxima und weisen auf das Vorliegen von rezeptortragenden Membranstrukturen bei d=1,12 bis 1,14 g/cm³ und d=1,16 bis 1,18 g/cm³ hin.

Der Aktivitätsgipfel der Mitochondrienmarkerenzyme ICDH und Cytochromoxidase lag bei d=1,12 g/cm³ (Peak III) mit 2,8 bzw. 3,2--facher Anreicherung, bei d=1,18 g/cm³ konnte eine 1,9 bzw. 2,8--fache Anreicherung gegenüber dem Grobhomogenat gemessen werden. In der Literatur wird das Aktivitätsmaximum der Cytochromoxidase bei d=1,15 und 1,20 g/cm³ (16), bei d=1,18 g/cm³ (12) und in den Zwischenschichten zwischen d=1,04 und 1,15 g/cm³ und d=1,15 und 1,18 g/cm³ (47) beschrieben. Die Citratsynthaseaktivität war bei d=1,21 und d=1,18 g/cm³ (Peak I und II) jeweils 2,2-fach angereichert. Diese Ergebnisse lassen wie die unterschiedlichen Angaben in der Literatur auf das Vorliegen von Mitochondrien in allen drei Proteinbanden der Dichtegradientenpräparation schliessen.

ß-Glucuronidase (Lysosomen-Marker) und Glucose-6-Phosphatase (ER-Marker) zeigten die höchste Aktivität mit 14,1 bzw. 3,4--facher Anreicherung bei d=1,12 g/cm³ (Peak III); die Glucose--6-Phosphatase wird in der Literatur mit Aktivitätsmaxima bei

d=1,13 und d=1,20 g/cm³ (16), aber auch mit gleichbleibender Verteilung über einen kontinuierlichen Dichtegradienten (50 bis 20 % Saccharose) (12) beschrieben. In Peak III lassen sich also auch Fragmente von membranhaltigen intrazellulären Organellen vermuten.

Die elektronenoptischen Untersuchungen bestätigten die von der Bindungs- und Enzymmusterverteilung abgeleiteten Ergebnisse: in Peak III (d=1,12 g/cm³) konnten Plasmamembranen und Lysosomen dargestellt werden; die Fraktion enthielt auch Mitochondrien. SUZUKI et al. (47) beschrieben in der Schicht zwischen d=1,04 und 1,15 g/cm³ kurze Membranbuchstücke und - Vesikel, in der Schicht zwischen d=1,15 und 1,18 g/cm³ einzelne Membranbruchstücke und vor allem Verbindungsbrücken zwischen einzelnen Zellen ("tight-" bzw. "gap junctions"). Unsere Präparation zeigte bei d=1,17 bis 1,18 g/cm³ (Peak II) Mitochondrien und Lysosomen.

Aus den von anderen Autoren beschriebenen Resultaten und unseren eigenen Untersuchungsergebnissen läßt sich schließen, daß Membranpartikel, die von ER, Golgiapparat, Lysosomen und Plasmamembranen stammen können, bei einer Dichte von 1,12 g/cm³ und 1,16 bis 1,18 g/cm³ gefunden werden können. Der Grund ist in unvollständiger Abtrennung oder unterschiedlichem Dichteverhalten der heterogenen Membranen zu suchen.

5. Zusammenfassung

Bei der Präparation von Schilddrüsenplasmamembranen, die in TSH-Bindungsversuchen eingesetzt werden sollen, stellte sich die Verwendung eines hypotonen Mediums als vorteilhaft heraus. Die Entscheidung für den physiologischen pH-Wert und möglichst niedrige Salzkonzentrationen fiel anhand von Ergebnissen der Literatur.

Die weitere Auftrennung über ein Zweiphasensystem brachte keine Anreicherung von Plasmamembranen mit TSH-Rezeptoren.

Die Auftrennung über kontinuierliche und diskontinuierliche Saccharosegradienten ergab jeweils zwei TSH-bindende Proteingipfel bei d=1,12 bis 1,14 g/cm³ (Peak III) und d=1,16 bis 1,18 g/cm³ (Peak II). Dies steht im Einklang mit der Literatur. Diese Auftrennung war von hohen Proteinverlusten begleitet, die Ausbeute an angereichertem Material war sehr gering. Bindendes Material in Peak III wies eine etwas höhere Rezeptoraffinität auf als Peak II. Wir vermuten, daß in den TSH-bindenden Präparationen ein und der derselbe Rezeptor in unterschiedlicher Anreicherung vorliegt.

Die Enzymmusterbestimmung zeigte eine Aktivitätsanreicherung der Membranmarkerenzyme in Peak II, das Aktivitätsmaximum jedoch in Peak III. Auch die Aktivitätsgipfel der Markerenzyme für Lysosomen, endoplasmatisches Retikulum und Cytosol lagen in diesem Dichtebereich. Die Mitochondrienmarker waren unterschiedlich verteilt und wiesen auf das Vorhandensein von Mitochondrien in beiden TSH-bindenden Proteinpeaks hin. Die durch das Enzymmuster beschriebene Verteilung der Zellorganellen in den Dichtebanden wurde elektronenoptisch bestätigt.

TSH-bindende Schilddrüsenplasmamembranen wurden mittels isoelektrischer Fokussierung im Bereich von pH 3,62 bis 4,13 gefunden.

Die Methode, die die größte Anreicherung von TSH-bindendem Material erzielt, ist die Auftrennung durch isopyknische Zentrifugation über Dichtegradienten.

Die Proteinverluste dieser Methode sind sehr hoch, bei geringer Ausbeute an spezifisch TSH-bindendem Material. Auch diese geringen

Mengen membranreichen Proteins sind mit anderen Zellorganellen kontaminiert. Nur mit bovinem Ausgangsmaterial ließen sich gut reproduzierbare Ergebnisse erzielen, die auf eine Anreicherung von TSH-bindenden Strukturen und geringgradig gesteigerte Empfindlichkeit im RRA hinweisen.

Materialverlust, geringer Reinheitsgrad und zeitlicher wie materieller Aufwand lassen die geprüften Anreicherungsmethoden ungeeignet erscheinen, zur Gewinnung von Rezeptormaterial für umfangreichere Studien der TSH-verdrängenden Aktivität im IgG hyperthyreoter Patienten angewandt zu werden.

Literaturverzeichnis

1. ADAMS, D.D., PURVES, H.D.: Abnormal Responses in the Assay of Thyrotropin. Proc. Univ. Otago Med. Sch. 34: 11 (1956)

2. AMIR, S.M., CARRAWAY, T.F.Jr., KOHN, L.D.: The Binding of Thyrotropin to Isolated Bovine Thyroid Plasma Membranes. J. Biol. Chem. 248: 4092 (1973)

3. ARONSON, N.N.Jr., TOUSTER, O.: Isolation of Rat Liver Plasma Membrane Fragments in Isotonic Sucrose. Methods in Enzymology Vol. XXXI, Biomembranes Part A ed. S. Fleischer/L. Packer, 90 (1974)

4. Arbeitsanleitung zur ß-Glucuronidase-Bestimmung Boehringer Mannheim GmbH, Kontroll-Labor Biochemie 2. Ausgabe Januar 1977

5. BAXTER, J.D., FUNDER, J.W.: Hormone Receptors. N. Engl. J. Med. 301: 1149 (1979)

6. Bio-rad Protein Assay Instruction Manual. Januar 1979, Bio-rad Laboratories, Richmond, CA

7. BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72: 248 (1976)

8. BRUNETTE, D.M., TILL, J.E.: A Rapid Method for the Isolation of L-Cell Surface Membranes Using an Aqueous Two-Phase Polymer System. J. Membr. Biol. 5: 215 (1971)

9. BRUNNER, G., HEIDRICH, H.G., GOLECKI, J.R., BAUER, H.C., SUTER, D., PLÜCKHAHN, P., FERBER, E.: Fractionation of Membrane Vesicles. II. A Method for Separation of Membrane Vesicles Bearing Different Enzymes by Free-Flow Electrophoresis. Biochem. Biophys. Acta 471: 195 (1977)

10. COOPERSTEIN, S.J., LAZAROW, A.: A Microspectrophotometric Method for the Determination of Cytochrome Oxidase. J. Biol. Chem. 189: 665 (1951)

11. CUATRECASAS, P.: Membrane Receptors. Ann. Rev. Biochem. 43: 169 (1974)

12. DE WOLF, M.J.S., LAGROU, A.R., HILDERSON, H.J.J., VAN DESSEL, G.A.F., DIERICK, W.S.H.: Subcellular Structure of Bovine Thyroid Gland. The Localisation of the Peroxidase Activity in Bovine Thyroid. Biochem. J. 174: 939 (1978)

13. EVANS, W.H.: Preparation and Characterisation of Mammalian Plasma Membranes. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, North Holland, 1978

14. EVANS, W.H.: A Biochemical Dissection of the Functional Polarity of the Plasma Membrane of the Hepatocycle. Biochem. Biophys. Acta 604: 27 (1980)

15. GRIFFITH, O.M.: Techniques of Preparative Zonal and Continous Flow Ultracentrifugation. 3rd edition, S. 9. Application Research Dept., Spinco Division Beckman Instruments, Palo Alto, CA

16. HILDERSON, H.J.J., DE WOLF, M.J.S., LAGROU, A.R., DIERICK, W.S.H.: Subcellular Structure of Bovine Thyroid Gland. A Study on Bovine Thyroid Membranes by Buoyant Densitiy Gradient Centrifugation in a B-XIV Zonal Rotor. Biochem. J. 152: 601 (1975)

17. HORN, K., SCRIBA, P.C.: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik I. Bestimmung des proteingebundenen Jods im Serum (PBJ^{127}). Dt. Ges. Klin. Chemie, Mitteil. Nr. 5, 3, 1970

18. JAMIESON, G.A., GROH, N.: Isoelectric Focusing of Human Blood Cell Membranes. Anal. Biochem. 43: 259 (1971)

19. JOHANSSON, G.: Partition of Salts and their Effects on Partition of Proteins in a Dextran-Poly-(Ethylene Glycol)-Water Two--Phase System. Biochem. Biophys. Acta, 221: 387 (1970)

20. KAHN, C.R., SOLL, A.H., NEVILLE Jr. D.M., GOLDFINE, J.D., ARCHER, J.A., GORDON, P., ROTH, J.: The Insulin Receptor in Obesitiy and Other States of Altered Insulin Sensitivity. Oct. 1-4, 1973, Bethesda, Md.

21. KOIZUMI, ZAKARIJA, M., McKENZIE, J.M.: Solubilization, Purification and Partial Characterization of Thyrotropin Receptor from Bovine and Human Thyroid Glands. Endocrinology 110: 1381 (1982)

22. KOTANI, M., KARIYA, T., FIELD, J.B.: Studies of Thyroid--Stimulating Hormone Binding to Bovine Thyroid Plasma Membranes. Metabolism 24: 959 (1975)

23. LANG, O.: Präparation von Leberzellplasmamembranen und Aufbau eines RRA für hGH (Dissertation). Ludwig-Maximilians-Universität München 1980

24. LESKO, L., DONLON, M., MARINETTI, G.V., HARE, J.D.: A Rapid Method for the Isolation of Rat Liver Plasma Membranes Using an Aqueous Two-Phase Polymer System. Biochem. Biophys. Acta 311: 173 (1973)

25. LKB 8100 Ampholine Bedienungsanleitung. LKB Produkter AB, Bromma, Schweden

26. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 (1951)

27. MARTIN, J.B., BOSHANS, R., REICHLIN, S.: Feedback Regulation of TSH-Secretion in Rats with Hypothalamic Lesions. Endocrinology 87: 1032 (1970)

28. McKENZIE, J.M.: Delayed Thyroid Response to Serum from Thyrotoxic Patients. Endocrinology 62: (1958)

29. McKENZIE, J.M.: Long-Acting Thyroid Stimulator of Graves' Disease. In: Handbook of Physiology, American Physiological Society, Endocrinology III, 1975, S. 285

30. McKENZIE, J.M., ZAKARIJA, M.: LATS in Graves' Disease. Rec. Progr. in Hormone Res. 33: 29 (1977)

31. MEHDI, S.Q., NUSSEY, S.S.: A Radio-Ligand Receptor Assay for the Long-Acting Thyroid Stimulator. Biochem. J. 145: 105 (1975)

32. MEHDI , S.Q., BADGER, J., KRISS, J.P.: Thyrotropin Binding and Long-Acting Thyroid Stimulator Absorbing Activities in Subcellular Fractions from Isolated Thyroid Cell and Thyroid Homogenates. Endocrinology 101: 59 (1977)

33. MEHDI, S.Q., KRISS, J.P.: Preparation of Radiolabelled Thyroid-Stimulating Immunoglobulins (TSI) by Recombining TSI Heavy Chains with ^{125}J-labelled Light Chains: Direct Evidence that the Product Binds to the Membrane Thyrotropin Receptor and Stimulates Adenylate Cyclase. Endocrinology 103: 296 (1978)

34. MOORE, W.V., WOLFF, J.: Thyroid-stimulating Hormone Binding to Beef Thyroid Membranes. J. Biol. Chem. 249: 6255 (1974)

35. OCHOA, S.: Cristalline Condensing Enzyme from Pig Heart. Methods in Enzymology Vol. I, 1955, S. 685 ed. S.P. Colowick/ N.O. Kaplan Acad. Press Inc. Publishers N.Y. 1955

36. PEKONEN, F., WEINTRAUB, B.D.: Thyrotropin Receptors on Bovine Thyroid Membranes: Two Types with Different Affinities and Specificities. Endocrinology 105: 352 (1979)

37. PERTOFT, H., LAURENT, T.C., LÅÅS, T., KÅGEDAL, L.: Density Gradients Prepared from colloidal Silica Particles Coated by Polyvinylpyrolidone (Percoll) Anal. Biochem. 88: 271 (1978)

38. PETERSEN, V.B., DAWES, P.J.D., SMITH, B.R., HALL, R.: The Interaction of Thyroid-Stimulating Antibodies with solubilised Human Thyrotrophin Receptors. FEBS Letters 83: 63 (1977)

39. PETERSON, G.L.: A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is more Generally Applicable. Anal. Biochem. 83: 346 (1977)

40. RICKWOOD, D.: Metrizamide: A Gradient Medium for Centrifugation Studies 2nd Edition, 1977, Nyegaard, Oslo, Norwegen

41. RODBARD, D.: Mathematics of Hormone-Receptor Interactions. Aus: Mathematics-Kinetics in Recent Studies Advances in Experimental Medicine and Biology, 36: 289 (1973)

42. SCATCHARD, G.: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949)

43. SMITH, B.R., HALL, R.: Binding of Thyroid Stimulators to Thyroid Membranes. FEBS Letters 42: 301 (1974)

44. SMITH, B.R., HALL, R.: Thyroid-Stimulating Immunoglobulins in Graves' Disease. Lancet 1974, II, 427

45. SMITH, B.R., PYLE, G.A., PETERSEN, V.B., HALL, R.: Interaction of Thyroid-Stimulating Antibodies With the Human Thyrotophin Receptor. Endocrinology 75: 401 (1977)

46. SMITH, B.R.: Thyrotropin Receptor Antibodies - Receptor Regulation - Receptors and Recognition, Series B, Vol.13; 217 ed. R.J. Lefkowitz, Chapman and Hall 1981

47. SUZUKI , S., WIDNELL, C.C., FIELD, J.B.: Preparation and Characterization of Subfractions of Bovine Thyroid Plasma Membranes.J. Biol. Chem. 252: 3074 (1977)

48. TATE, R.L., SCHWARTZ, H.J., HOLMES, J.M., KOHN, L.D.: Thyrotropin Receptors in Thyroid Plasma Membrans. J. Biol. Chem. 250: 6509 (1975)

49. VAN DENBROUCKE, M.F., EPPE, M., DE VISSCHER, M.: Subcellular Localization of Thyroglobulin Taken up by Pig Thyroid Slices Endocrinology 91:362 (1972)

50. VAN DEN HOVE-VANDENBROUCKE, M.F., DENAYER, P.: Separation of thyroid mitochondria and lysosomes. Exerpta medica, Int. Congress Series Nº 361, abstr. 82 7th Int. Thyroid Congress Boston Ma 1975

51. WALTER, H., SASAKAWA,S.: Partition of Closely Related Proteins in Aqueous Two-Polymer Phase Systems. Human Hemoglobin Variants and Hemoglobins from Different Species. Biochemistry 10: 108 (1971)

52. WINTER, A., KARLSSON, C.: Preparative Electrofocusing in Density Gradients. LKB Application note 219, April 1976

53. WISHER, M.H., EVANS, W.H.: Functional Polarity of the Rat Hepatocyte Surface Membrane. Biochem. J. 146: 375 (1975)

54. WOLFF, J., JONES, A.B.: The Purification of Bovine Thyroid Plasma Membranes and the Properties of Membrane-bound Adenyl Cyclase. J. Biol. Chem. 246: 3939 (1971)

55. YAMASHITA,K., FIELD, J.B.: Preparation of Thyroid Plasma Membranes Containing a TSH-Responsive Adenyl Cyclase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 40: 171 (1970)

56. ZAKARIJA, M., McKENZIE, J.M.: Adsorption of Thyroid-Stimulating Antibody (TSAb) of Graves' Disease by Homologous and Heterologous Thyroid Tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 906 (1978)

Lebenslauf

Am 14. Mai 1959 wurde ich als Sohn des Betriebsassistenten Walter Stoiber und seiner Frau Gabriele, geb. Kohler, in München geboren.

Von 1965 bis 1969 besuchte ich die Volksschule, zuerst in Riemerling/Hohenbrunn, dann in München. Ab 1969 besuchte ich das Luitpold-Gymnasium in München; dort legte ich im Mai 1977 die Reifeprüfung ab.

Im November 1977 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Humanmedizin. Hier bestand ich im August 1979 die Ärztliche Vorprüfung und begann im März 1980, an der vorliegenden Dissertation in der endokrinologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München zu arbeiten.

Im August 1980 legte ich den ersten, im August 1982 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Daran anschließend absolvierte ich das Praktische Jahr in München an der Medizinischen Klinik Innenstadt, der II. Chirurgischen Abteilung der Krankenanstalt des III. Ordens und der I. Universitätsfrauenklinik Maistraße. Mein Studium werde ich im Oktober 1983 mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung abschließen.

Frau Prof. Dr. C.R. Pickardt danke ich für die Überlassung des Themas, für das Interesse am Fortgang der Experimente, für viele nützliche Anregungen und ihren großen Einsatz bei der Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Buchborn danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. J. Habermann danke ich für die hilfreiche Unterstützung in praktischen und theoretischen Problemen, die wohlwollende Kritik und die freundschaftliche Betreuung, durch die die Arbeit ermöglicht wurde.

Frau A. Isemann und Fräulein L. Hörterer danke ich für die äußerst angenehme Zusammenarbeit im Labor. Herrn Dr. A. Witte danke ich für seine konstruktive Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. V. Herzog danke ich für die Anfertigung und Interpretation der elektronenoptischen Aufnahmen.

Ferner danke ich allen Angehörigen der endokrinologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt für die freundliche Aufnahme und die konstruktive Unterstützung der Arbeit. Herrn D.Reisner, Herrn W. Posch, Frau R. Solymár, Fräulein E. Márton und Fräulein F. Haag danke ich für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.